

九州大学中央分析センター報告

— 第20号 —

REPORT

OF

THE CENTER OF ADVANCED INSTRUMENTAL ANALYSIS

KYUSHU UNIVERSITY

NUMBER 20

2002

九州大学
中央分析センター

目 次

機器分析学の進歩

ナノテクノロジーの最先端

.....	岸田 昌浩, 草壁 克己 竹中 繁織	1
研究報告		
1.	¹¹ B NMR法によるホウ素選択性高分子の機能性に関する研究 吉村 和久, 邵 超英 松岡 史郎, 宮崎 義信	2
2.	ポリ(アミドアミン)デンドリマー存在下におけるpolyphenol 及びluminolの化学発光増感 中園 学, 馬 麗 近藤 直子, 財津 潔	12
3.	リチウム電池用ゲルポリマー電解質の熱安定性 川村 哲也, 江頭 港 渡辺 泉, 岡田 重人 山木 準一	20
4.	乳酸菌バクテリオシンを利用するバイオプリザベーション 善藤 威史, 島田 信也 谷本 保英, 相馬さやか 中山 二郎, 園元 謙二	30
5.	走査トンネル顕微鏡による表面シリサイド形成初期過程の観察: Si(111)7×7上のBa吸着による(3×1)構造 栃原 浩, 岡元 亮 水野 清義	40
6.	表面ゾル・ゲル法によるD-A連結型光電変換多層膜の作製 秋山 穀, 仁田原 智 寺崎 正, 山田 淳	45
7.	コラーゲンモデルペプチドの3本鎖の融解と新しい相の出現 坂下 寛文, 三浦 好典 渡辺美登里	50

—機器分析学の進歩—

中央分析センター講演会が下記の要領で開催されました。ナノテクノロジーの最先端の研究が紹介されました。3先生のご講演にもとづき多数の研究者による活発な議論が行われました。ここにその要旨を掲載します。

日 時：平成14年3月14日（木）14：00～16：00

場 所：21世紀交流プラザ2階講義室（箱崎理系地区）

テーマ：「ナノテクノロジーの最先端」

「ナノコンポジット粒子の合成と触媒への応用」

工学研究院 化学工学部門 岸田 昌浩

金属ナノ粒子をナノスケールのシリカで包接したナノコンポジット粒子に関して、マイクロエマルジョンを利用した合成法、その構造の制御法及び触媒等への工学的応用を紹介する。シリカ中における金属ナノ粒子の1次元配列制御についても言及する。

「マイクロ流体デバイスを用いた化学反応」

工学研究院 応用化学部門 草壁 克己

マイクロチャネルからなる流体デバイスを化学反応に利用したマイクロリアクターについて解説を行う。特に触媒反応系に関して、触媒調整法、マイクロ燃料電池や触媒スクリーニング装置の最近の研究を紹介する。

「電気化学的アレイチップの開発と遺伝子診断への応用」

工学研究院 応用化学部門 竹中 繁織

ヒトゲノムプロジェクトの成果によって個人レベルでの遺伝子診断がますます必要となってきた。これを達成する技術として従来のDNAマイクロアレイに対し電気化学的アレイ（Electrochemical array, ECA）チップを利用した次世代技術が期待されている。ここではECAチップを用いた迅速・簡便な遺伝子診断法について紹介する。

¹¹B NMR法によるホウ素選択性高分子の機能性に関する研究

九州大学大学院理学研究院 *福岡教育大学教育学部

吉村 和久・邵 超英・松岡 史郎・*宮崎 義信

¹¹B NMR study on the complexation of borate with boron-selective polymers

Kazuhisa Yoshimura¹, Chaoying Shao¹, Shiro Matsuoka¹,
and Yoshinobu Miyazaki²

¹ Faculty of Sciences, Kyushu University, Ropponmatsu, Chuo-ku, Fukuoka 810-8560

² Department of Chemistry, Fukuoka University of Education, Akama, Munakata 811-4192

¹¹B NMR spectroscopy is one of the excellent tools for elucidating the nature of the interaction between borate and boron-selective adsorbents such as crosslinked dextran gel (Sephadex), anion-exchange dextran gel (QAE-Sephadex), and chelating resins with functional groups of N-methyl-glucamine (Amberlite IRA-743) and of chromotropic acid (commercially unavailable). In the dextran system, borate complexes both with α,β -diols and α,γ -diols of glucopyranoside residues were present. The crosslinking of dextran caused the effective concentration of α,β -diol moieties in the crosslinked polymer ligand, so that the 1:2 complexation became more favorable according to the increase in the degree of crosslinking. The stability constant of each complex for the QAE-Sephadex system was similar to that for the Sephadex system, and therefore the presence of the fixed cationic group in the QAE-Sephadex gel phase did not enhance the boron adsorption. The pH of the N-methyl-glucamine resin phase remains constant in the range of 10.5 to 12.5 when the equilibrated bulk solution is pH 6 - 11. The strong adsorbability of borate on the resin in a wide pH range was related to this phenomenon. From the ¹¹B MAS-NMR measurements, the active species in the resin were proved to be the α,β bischelate 1:1 complex with the functional groups. In the case of the chromotropic acid system, the 1:2 complex is predominant in acidic solution, while the 1:1 complex is mainly distributed over a higher pH range. The 1:2 complexation was found to be catalyzed by hydrogen ions. pH dependence of the boron adsorbability on the chromotropic acid loaded resin could be understood on the basis of both the reaction equilibrium and kinetics.

1. はじめに

弱酸であるホウ酸を酸塩基滴定により定量する際にマンニトールを加えることが有効であることは古くから知られている。ホウ酸が、糖類などのポリオール（ポリヒドロキシ化合物）との脱水縮合によりキレート錯体を生成して、より強い酸となる性質を利用したものである。錯体の安定性はポリオール中の水酸基の絶対配置に大きく依存するため、糖の水酸基の絶対配置が決定され始めた初期には、錯生成に伴うpH変化や電導度変化の追跡が大きな役割を果たした。また、ボロン酸のようなホウ素オキソ酸を官能基として導入した高機能性高分子は、各種糖の選択的認識を期待して開発してきた。

それに対して、ポリオールを官能基とする吸着剤が、農業用水や高純度水からのホウ酸の除去、海水からのホウ酸の回収、天然水からの微量ホウ酸の選択的濃縮、ホウ素の同位体分離などに用いられてきた。しかし、吸着化学種を直接観測する手法を持たなかつたために、その吸着のメカニズムに関しては、錯形成が関与すること以上の詳細な情報は得られなかつた。近年、¹¹B NMR法の発展を契機に、ホウ素吸着剤の機能性発現に関して定量的な理解が可能となってきた。新規吸着剤開発のためにも、既存の吸着剤に対する吸着メ

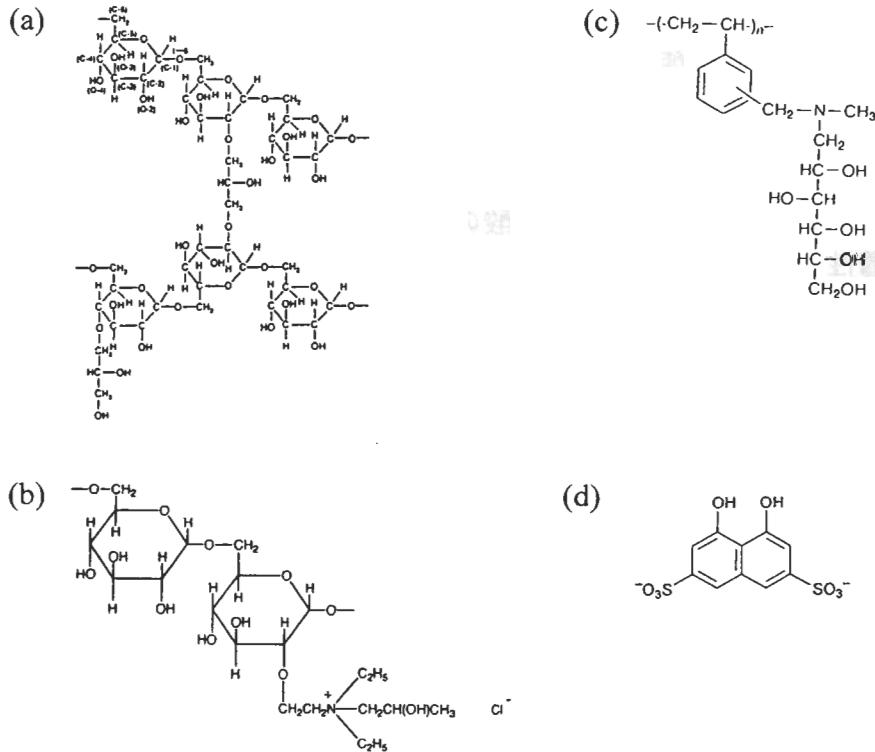


Fig. 1. Functional groups of boron-selective adsorbents.

(a) Crosslinked dextran gel,

(c) N-methyl-glucamine resin,

(b) Anion-exchange dextran gel,

(d) Chromotropic acid.

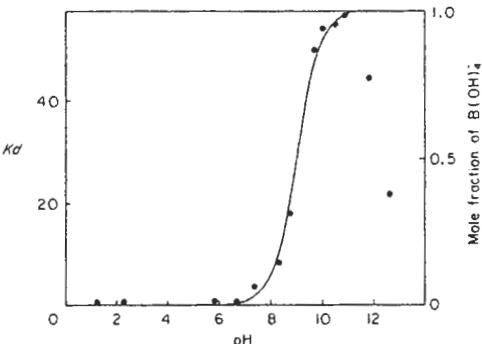


Fig. 2. pH dependence of the adsorption of boric acid on Sephadex G-25 gel ($I = 0.1$, NaCl).
Distribution ratio (K_d) = [total B in gel phase]/[total B in solution]

カニズムの理解は重要である。ここでは、4種の吸着剤へのホウ酸の吸着に関する錯生成について、 ^{11}B NMR測定結果を中心に紹介する。

2. デキストランゲルへのホウ酸の吸着性

デキストランを架橋したセファデックスゲル (Fig. 1a) は、ゲルマトリックス中にグルコピラノシリル基を有するために、特別なイオン交換基は導入されていないにもかかわらず、金属オキソ酸に対して特異的な吸着体となる¹。ホウ酸のセファデックスゲルへの吸着性は、pHにより変化する。ホウ酸の分配比は、 $\text{B}(\text{OH})_4^-$ 化学種の生成分率曲線とはほぼ一致するかたちで増加した (Fig. 2)。したがって、弱アルカリ性の溶液からホウ酸の濃縮ができるだけでなく、希酸を流すことでの完全な回収が可能であった。イオン交換とは異なるメカニズムで濃縮が行われるため、共存電解質の影響をほとんど受けることがなく、海水等の高濃度電解質溶液からのホウ酸の回収も可能であった。脱着剤が希薄な酸溶液ですむために、ICP-AESやICP-MSの前処理法としても最適である。

ホウ酸とグルコピラノシリル基との相互作用を、モノマー、ポリマーおよびそれがさらに架橋されることの効果を含めて評価すること目的として、 ^{11}B NMRスペクトルの測定を

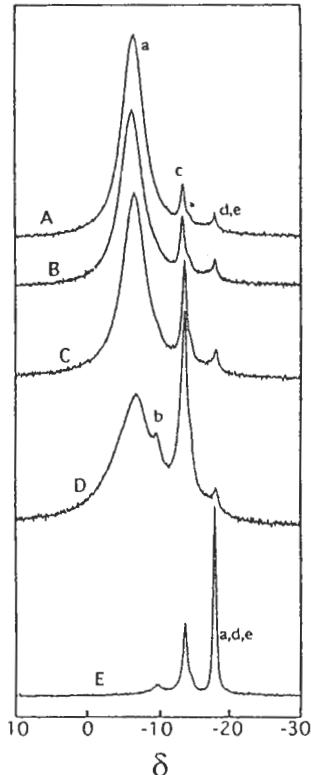


Fig. 3. ^{11}B NMR spectra for Sephadex gel beds equilibrated with solutions containing 0.02 mol dm^{-3} boric acid/borate ($I = 0.1$, NaCl; external reference: $0.1 \text{ mol dm}^{-3} \text{B}(\text{OH})_3$).
A: Sephadex G-100 (pH 8.94), B: G-75 (8.92), C: G-50 (8.91), D: G-25 (8.88), E: G-25 (11.70).
a: free; b: 1:2(α,β); c: 1:1(α,β); d: 1:1(α,γ); e: 1:2(α,γ);
*binding isomer of c

Table 1. ^{11}B NMR chemical shifts and stability constants of binding isomers of borate complexes with compounds containing vicinal hydroxyl groups (at 25°C)

	1:1 complex ^a				1:2 complex ^c			
	$\delta_{1:1(\alpha,\beta)}$	$\beta_{1(\alpha,\beta)}$	$\delta_{1:1(\alpha,\gamma)}$	$\beta_{1(\alpha,\gamma)}$	$\delta_{1:2(\alpha,\beta)}$	$\beta_{2(\alpha,\beta)}$	$\delta_{1:2(\alpha,\gamma)}$	$\beta_{2(\alpha,\gamma)}$
polyols ³	-12.6～-14.9		-17.9～-18.5		-7.7～-11.9		-18.4～-19.0	
α -methyl-D-glucopyranoside ²	-13.0	0.18	-18.0	2.9	n.d.	-	-18.0	2.6
Dextran T-40 ³	-13.1	0.15	-17.6	0.14	n.d.	-	-18.1	0.18
N-methyl-D-glucamine ⁵	-13.7	$10^{4.90}$	n.d.	-	-9.4	$10^{6.32}$	n.d.	-
Chromotropic acid ⁷	n.d.	-	-17.7	$10^{-1.57}$ ^b	n.d.	-	-18.0	10^{+15} ^d
Sephadex G-100 ²	-13.4	0.54	-17.9	0.29	n.d.	-	-18.1	0.38
G-50 ²	-13.5	1.0	-18.1	0.19	-9.8	<0.01	-18.1	0.27
G-25 ²	-13.6	0.94	-18.3	0.09	-9.7	0.03	-18.1	0.02
QAE-Sephadex A-25 ⁴	-13.4	0.96	-18.0	0.14	n.d.	-	n.d.	-
Amberlite IRA-743 ⁵	n.d.	-	n.d.	-	-10.2	$10^{4.0}$	n.d.	-

n.d. : not detected. ^a $\text{B}(\text{OH})_4^- + \text{L} \rightleftharpoons \text{BL}^- + 2 \text{H}_2\text{O}$; ^b $\text{B}(\text{OH})_3 + \text{H}_2\text{R}^{2-} \rightleftharpoons \text{BR}(\text{OH})_2^{+} + \text{H}_3\text{O}^+$; ^c $\text{B}(\text{OH})_4^- + 2 \text{L} \rightleftharpoons \text{BL}_2^- + 2 \text{H}_2\text{O}$; ^d $\text{B}(\text{OH})_3 + 2 \text{H}_2\text{R}^{2-} \rightleftharpoons \text{BR}_2^{+} + \text{H}_3\text{O}^+ + 2 \text{H}_2\text{O}$

行つた²。グルコピラノシリル基を有する化合物としてデキストラン、架橋度の異なるセファデックスゲル、および α -メチル-D-グルコピラノシドを用いた。

Fig. 3に、通常の溶液法と同様に、PTFE製NMR管にホウ酸が吸着したセファデックスゲルを平衡溶液とともに充填して測定した ^{11}B NMRスペクトルを示した。フリーのホウ酸化学種には $\text{B}(\text{OH})_3$ と $\text{B}(\text{OH})_4^-$ があり、それぞれの化学種は δ 0と-18.6のケミカルシフト固有値をもつ。シャープなシグナルを与えるほどではないが、これらの化学種間の速い交換のために、 ^{11}B NMRスペクトルは1本の線幅の広いピークとして観測され、pHが高くなると $\text{B}(\text{OH})_4^-$ の生成率が大きくなつて高磁場側にシフトする(D, E)。他の2本のピークは錯体によるものであり、ホウ酸とゲル骨格との錯生成に起因する。これらのスペクトルはpHが変化してもシフトせず、 δ -17.7～-18.3および-13.4～-13.7にはほぼ同じケミカルシフト値を与える化学種が存在することが明らかとなった。これらはデキストランゲルの架橋度にかかわらず観測された。また、架橋度の高いゲルの場合、 δ -9.8に新たにピークが現れた。溶液法と同じ手法で固相のスペクトルが観測できたきわめて稀な例である。

van Duinら³は、ポリオールとホウ酸の相互作用を ^{11}B NMR法を用いて研究し、ポリオールの種類によらず、ホウ酸錯体の配位異性体が特定のケミカルシフト値をとることを報告した。これらの値を参考にすると、それぞれのピークはTable 1のように帰属できる。Fig. 4に、 α -D-グルコースのとり得る2つの椅子型コンホメーション(C1および1C)とそれぞれのホウ素錯体の例を示した。 α -D-グルコースのO-O間距離は、C1コンホメーションではO4-O6間を除いて、いずれも0.28 nmである。それに対して、1CのコンホメーションではO2-O4が0.25 nm、O3-O6間はさらに接近することが可能である。ホウ酸陰イオンのO-O間距離は0.24 nmであり、 α,β 位および α,γ 位の水酸基とのキレート生成はそれほど大きな立体的制約は受けない。 α -メチル-D-グルコピラノシド、デキストラン、架橋デキストラン中の α -D-グルコピラノシリル残基がC1のコンホメーションをとる時には、

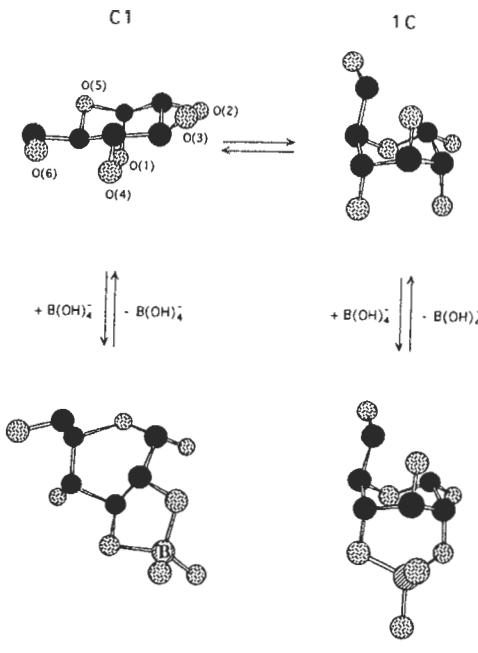


Fig. 4. Conformational and complexing equilibria of the glucopyranoside residue with borate.

equatorial配置の2,3位または3,4位のOH基 (α,β 型) と $B(OH)_4^-$ の間の脱水縮合が5員環キレートを、 1Cコンホメーションの場合はaxial配置の2,4位あるいは4,6位のOH基 (α,γ 型) と 6員環キレートを生成する。低磁場側が α,β 位、 高磁場側が α,γ 位の水酸基と脱水縮合的に結合した錯体となる。

面積強度比から求めた錯生成定数を対比することで、 α -D-グルコピラノシル残基のコンホメーションが錯形成に大きく関与することがわかった (Table 1)。 α -メチル-D-グルコピラノシド、 デキストラン、 架橋デキストランの順にグルコピラノシル残基のコンホメーションが1CからC1優勢になる。架橋デキストランゲルの場合、 架橋によるグルコピラノシル残基のコンホメーションの固定がホウ酸の吸着性を増加させることが示唆された。このように、 $B(OH)_4^-$ はグルコピラノシル残基と反応して1:1および1:2錯体を生成し、 α,γ 位 (2,4位) のOH基および α,β 位のOH基と脱水縮合した結合異性体が存在する。その安定度は、 糖鎖の優勢なコンホメーションと密接に関連していると考えられる。

3. 隣イオン交換デキストランゲルへのホウ酸の吸着性

吸着による陰イオン固定基の発現が吸着性を低下させることが予想されたため、 その効果を軽減する可能性について陽イオンを官能基としてもつ陰イオン交換体セファデックスを用いて検討を行った。

QAE-Sephadexのイオン交換基をFig. 1bに示した。ホウ酸イオンを吸着させたQAE-Sephadex A-25のゲル相の ^{11}B NMRスペクトルは、 Sephadexゲル系²⁾と同様に、 フリーの

ホウ酸化学種については線幅の広い1本のピークとして現れ、pHの上昇に伴い高磁場側にシフトする (Fig. 5)。しかし pH 9 前後では、フリーのホウ酸化学種のピークは2本のシグナルに分離して観測された。ゲルの内部と外部の間での交換が¹¹B NMRスペクトルのタイムスケールに比べて遅いためである。低磁場側のピークが外部溶液のフリーのホウ酸化学種のシグナル、高磁場側の線幅がやや広いピークがゲル相溶液のフリーのホウ酸化学種のシグナルで、ゲル相のpHがそれと平衡にある外部溶液のpHよりも高いことが示唆された。その他のピークは錯体によるもので、ホウ素-Sephadex G-25錯体の¹¹B NMRスペクトルの場合と同様に、pHが変化してもシフトせず、pHが高いほどその面積強度はフリーのピークのものに比べて大きくなった。 δ -13前後のピークが α,β 型錯体、-18前後のピークが α,γ 型錯体によるものである。

¹¹B NMRスペクトルの面積強度より計算したゲル相での各ホウ酸錯体の生成定数をTable 1 に示した。Sephadex G-25およびQAE-Sephadex A-25における錯体の生成定数を比較すると、あまり差がないことが分かる。すなわち、セファデックスゲルに導入された正電荷の固定基と錯生成に伴って発現する負電荷との相互作用は小さいことが示唆された。

4. N-メチルグルカミン樹脂へのホウ酸の吸着性⁵⁾

N-メチルグルカミン樹脂 (Fig. 1c) へのホウ酸の吸着は、デキストラン系吸着剤と異なり、弱酸性領域にまで広がる。もともと米国において、高濃度ホウ素を含む灌漑用水からのホウ素除去を目的として Rohm & Haas社により開発されたものであり、Amberlite IRA-743 (またはXE-243)として市販されている。また、同様の官能基を有するものが国内外の数社から販売されている。中性の溶液からのホウ素の捕集が可能であり、その吸着性は極めて高い。

Fig. 6は分配比のpH依存性を示したものである。pH 6以上の溶液で吸着性を示し、pH 9で最大となった。官能基のNは、3級と4級がほぼ1:1であり、強塩基性および弱塩基性のイオン交換特性を示し、ホウ酸の飽和吸着量は官能基量と一致した。さらに、Nにプロトンが付加するpH条件と付加しないpH条件でのN-メチル-D-グルカミン溶液の¹¹B NMRスペクトルの比較により、Nは配位に関与せず、1:1 および 1:2 の α,β 型錯体の存在が確認された (Table 1d)。また、MAS-NMR測定結果は、樹脂中では α,β 型ビスキレート錯体の

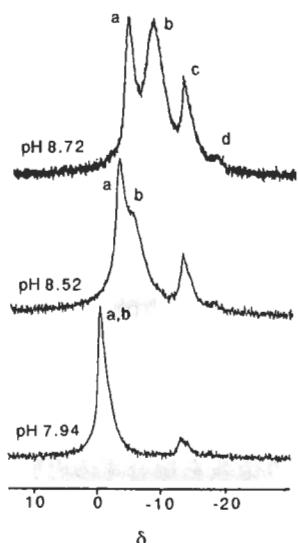


Fig. 5. ¹¹B NMR spectra for QAE-Sephadex gel beds equilibrated with solutions containing 0.02 mol dm⁻³ boric acid/borate ($I = 0.1$, NaCl; external reference: 0.1 mol dm⁻³ $B(OH)_3$).

a: free in solution; b: free in gel phase; c: 1:1(α,β); d: 1:1(α,γ)

みが生成していることを示唆しており、吸着には官能基中のポリオールが関与することが明らかとなった。樹脂相での錯体の生成定数は 10^4 であり、溶液中でのN-メチル-D-グルカミンとの1:1錯体の生成定数とほぼ一致した。さらに、樹脂に拡散させたリン酸の酸解離をプローブとして用い、³¹P NMR測定から樹脂内部のpHを推定すると、外部溶液の広いpH領域(pH 6~11)で樹脂内部のpHが外部溶液よりも高くかつその変化は小さい(pH 10.5~12.5)ことがわかった。

以上の情報を総合すると、樹脂内ではFig. 7に示す α,β 型ビスキレート錯体が生成すること、外部溶液よりも樹脂内のpHは高く、これが広いpH領域でのホウ酸の吸着性の原因であることが明らかとなった。また、 $B(OH)_3$ は自由に樹脂相に拡散できる(選択係数が1)と仮定すると、Fig. 6の吸着のpH依存性も定量的に理解することができた。

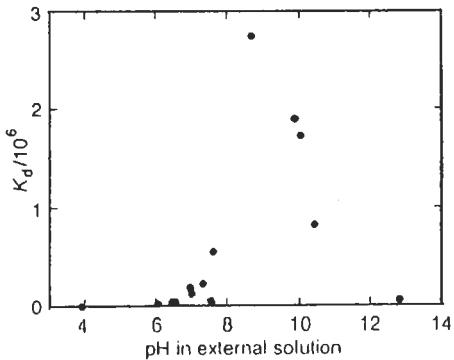


Fig. 6. pH dependence of the adsorption of boric acid on N-methyl-glucamine resin ($I = 0.1$, NaCl).

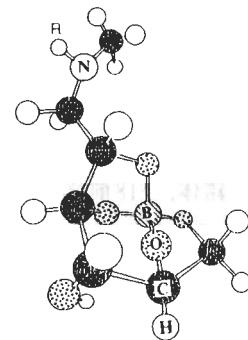


Fig. 7. Possible binding structure of complexes of borate with N-methyl-glucamine groups in Amberlite IRA-743 (R: polystyrene chain for the resin).

5. クロモトロープ酸担持陰イオン交換体へのホウ酸の吸着性

半導体製造における洗浄用水からのホウ酸除去のために、クロモトロープ酸担持イオン交換体が開発された⁶。この樹脂のホウ素吸着の至適pH範囲は1.8~4.5であるが、pH 2~10の広い範囲でホウ素に対する吸着性を示す。ホウ酸とクロモトロープ酸(Fig. 1d)の錯生成反応に関する研究はホウ素の微量分析法開発のため古くから行われていたが、我々の結果はこれまで報告されたホウ酸とクロモトロープ酸の反応性の至適pH領域3~7と異なっていた。

Fig. 8はホウ酸-クロモトロープ酸系の¹¹B NMRスペクトルである。pH 2~10の広い範囲において2種の錯体が生成することが明らかになった。異なる濃度比のホウ酸とクロモトロープ酸混合溶液についての¹¹B NMRスペクトルを比較することで、 δ -17.7のピークは1:1錯体、 δ -18.0のピークは1:2錯体に帰属できた(Table 1)⁷。今まで見てきた系と異なり、1:1錯生成には $B(OH)_3$ が関与し、錯生成に際して平面構造から四面体構造へ変化する。一方、1:2錯生成は2分子の水が生成する脱水縮合タイプの反応である。これらの錯生成が(1), (2)の反応式に従うとして、それぞれの反応の平衡定数を求めた。それらの値

を用いて、与えられた条件下で平衡溶液中に存在する各ホウ素化学種の濃度を算出し、溶液のpHに対してプロットしたものがFig. 9である。計算値とNMRによる実測値がすべてのpH領域でよくあっていることがわかる。

Fig. 9の曲線cが示すように、クロモトロープ酸担持イオン交換体のホウ素吸着の至適pH範囲1.8~4.5は1:2錯体が生成する領域であり、強い吸着性には1:2錯体の関与が予想される。しかし、それ以上のpHでも1:2錯体は存在するにもかかわらず吸着性が低下する点については、平衡論的な考察だけでは完全には理解することはできなかった。そこで、錯体の生成に関する速度論的考察も合わせて行ったところ、1:2錯生成の反応速度は1:1錯生成に比べて著しく小さく、さらに1:2錯生成反応の速度定数は正反応および逆反応のいずれもが溶液の水素イオン濃度に対して一次に比例し、プロトン触媒が反応に関与することがわかった。得られた速度定数を用いて算出した1:2錯体生成の時間依存性（Fig. 10）を見ると、溶液のpHが3のとき1:2錯生成反応は3分以内に平衡になるが、pH 7では5日間を経ても平衡には到達しない。ホウ酸-クロモトロープ酸錯生成系では、錯体全体の生成分率は低下するものの、pHが低いほど1:2錯体が優先的に生成しその生成速度が大きくなる。クロモトロープ酸担持イオン交換体の場合は、樹脂内のクロ

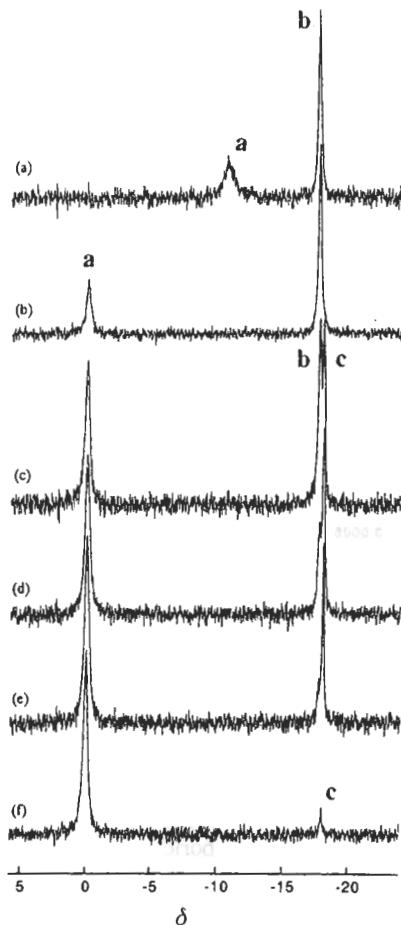
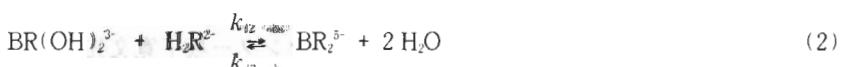


Fig. 8. ^{11}B NMR spectra for boric acid solutions containing chromotropic acid at different pH values ($C_{\text{B}} = C_{\text{R}} = 0.00185 \text{ mol dm}^{-3}$; $I = 0.1$, NaCl; external reference: 0.1 mol dm^{-3} $\text{B}(\text{OH})_3$).

pH: (a) 9.46; (b) 6.77; (c) 5.36; (d) 4.54; (e) 3.56; (f) 2.05. a, boric acid/borate; b, 1:1 complex; c, 1:2 complex.



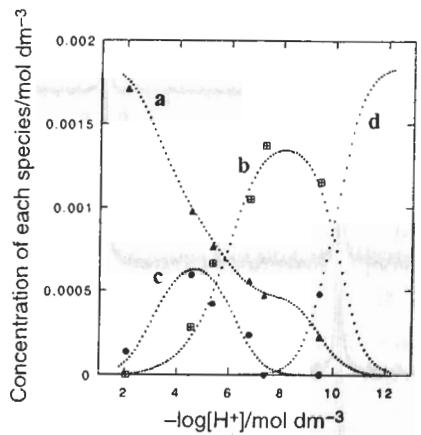


Fig. 9. Concentration of each boron species against pH in the equilibrated solution ($C_H = C_R = 0.00185 \text{ mol dm}^{-3}$; $I = 0.1$, NaCl; external reference: 0.1 mol dm^{-3} B(OH)_3). a, boric acid; b, 1:1 complex; c, 1:2 complex; d, B(OH)_4^- .

モトロープ酸濃度は 1 mol dm^{-3} オーダーであるので、1:2錯生成が十分に進行し得る配位子濃度であり、pHの低い方がホウ素に対して良好な吸着性を示すことになる。このようにして、クロモトロープ酸担持イオン交換体の機能性は錯生成の平衡論と速度論の両方が関与して発現していることが明らかになった。

6. おわりに

今まで見てきたように、ホウ素選択性高分子の機能性は、吸着剤骨格あるいは官能基として導入されたポリオールとホウ酸の錯生成として理解できた。また、その定量的な評価のためには、吸着実験ばかりでなく¹¹B NMR測定が有効な手段であった。

クロモトロープ酸系については、反応性の特徴を利用して超微量ホウ酸の定量法⁸に展開しており、また今までに得られた指導原理をもとに新たな官能基の開発・応用が進行しつつある。

本研究のNMR測定のほとんどは、九州大学中央分析センターJEOL JNM-GX 400および500を用いて行った。測定にご協力いただいた中央分析センター坂下寛文先生に深く感謝申し上げます。また、本研究に要した費用の一部は、(財)鉄鋼業環境保全技術開発基金平成14年度一般研究助成金を用いた。あわせて感謝申し上げます。

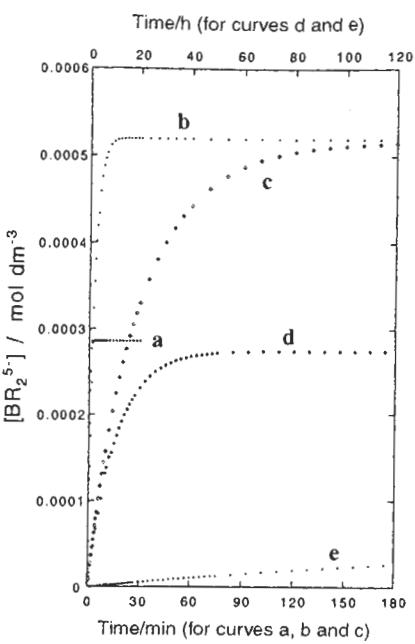


Fig. 10. Concentration change of the bis complex with reaction time under different pH conditions ($C_H = C_R = 0.00185 \text{ mol dm}^{-3}$; $I = 0.1$, NaCl). pH: a, 3; b, 4; c, 5; d, 6; e, 7

参考文献

1. K. Yoshimura, R. Kariya and T. Tarutani, *Anal. Chim. Acta*, **109**, 115 (1979).
2. K. Yoshimura, Y. Miyazaki, S. Sawada and H. Waki, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **92**(4), 651 (1996).
3. M. van Duin, J.A. Peters, A. P.G. Kieboom and H. van Bekkum, *Tetrahedron*, **41**, 3411 (1985).
4. C. Shao, Y. Miyazaki, S. Matsuoka, K. Yoshimura and H. Sakashita, *Macromolecules*, **33**(1), 19 (2000).
5. K. Yoshimura, Y. Miyazaki, F. Ota, S. Matsuoka and H. Sakashita, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **94**(5), 683 (1998).
6. T. M. Suzuki, D. A. P. Tanaka, T. Yokoyama, Y. Miyazaki and K. Yoshimura, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1999**(10), 1639.
7. C. Shao, S. Matsuoka, Y. Miyazaki, K. Yoshimura, T. M. Suzuki and D. A. P. Tanaka, *ibid.*, **2000**(18), 3136.
8. C. Shao, S. Matsuoka, Y. Miyazaki and K. Yoshimura, *Analyst (London)*, **127**(12), 1614 (2002).

ポリ(アミドアミン) デンドリマー存在下における polyphenol 及び luminol の化学発光増感

九州大学大学院薬学研究院

中園 学, 馬 麗, 近藤 直子, 財津 潔

Chemiluminescence enhancement of polyphenol and luminol
in the presence of poly (amidoamine) dendrimer

Manabu Nakazono, Li Ma, Naoko Kondo and Kiyoshi Zaitsu

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

Abstract

The chemiluminescence (CL) enhancement of polyphenol such as pyrogallol (PY), gallic acid (GA) and methyl gallate (MG) or luminol in the presence of poly (amidoamine) dendrimer (Starburst)[®](PAMAM) was compared. The total photon counts of PY and MG in the presence of PAMAM-generation 0 were enhanced 2.4- and 1.3-fold, respectively. Similarly, the total photon count of MG in the presence of PAMAM-generation 1 was enhanced 2.7-fold. Especially, the CL peak height of MG in the presence of PAMAM-generation 1 was enhanced 13.5-fold.

1. 序論

化学発光計測法は、高感度な計測法の一つとして知られており、吸光法や蛍光法と異なり光源を必要としない計測法が可能であり、Luminol 誘導体及び Acridinium ester を用いる化学発光イムノアッセイによる Progesterone¹⁾ や Thyroide stimulating hormon^{2,3)}、フローインジェクション分析法による血中 glucose⁴⁾ 等の高感度化学発光計測がある。化学発光計測法はタンパクや核酸研究等の生化学分野でも広く適用されており、今後さらに微量量化が要求される生体成分の検出における応用が期待されている。

高感度化学発光計測法の開発の一方向として、増感剤の開発がなされてきた。例えば、Peroxidase 存在下、*p*-Iodophenol は Luminol に対して、*trans*-4-(3-Propionic acid) phenylboronic acid は Pyrogallol に対して著しい増感効果を示す事が報告されている^{5,6)}。当研究室でも水溶性カルボジイミドである 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide · HCl がポリフェノール類に対して著しい増感効果を示すことを見出している⁷⁾。また、界面活性剤の化学発光物質に対する増感効果も報告されている⁸⁻¹⁰⁾。この増感効果は、溶液中で界

面活性剤が形成するミセルが化学発光における酸化反応を加速すること及びより疎水的な環境を提供することによるものと考えられている。

近年 Tomalia 等によって新規な高分子化合物である Poly (amidoamine) dendrimer Starburst[®] (PAMAM) が合成されている (Fig. 1)¹¹⁾。この PAMAM に代表されるデンドリマーは樹木状多分岐高分子であり、中心部にあるコアから骨格となるユニットが外表面に向かって規則正しい枝別れを繰り返す構造を持っている。現在、コアと骨格を目的に合

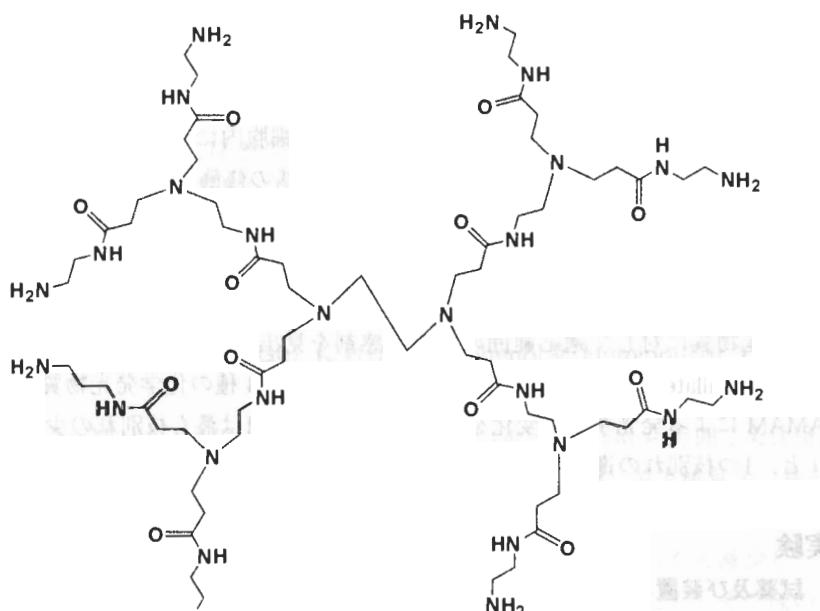
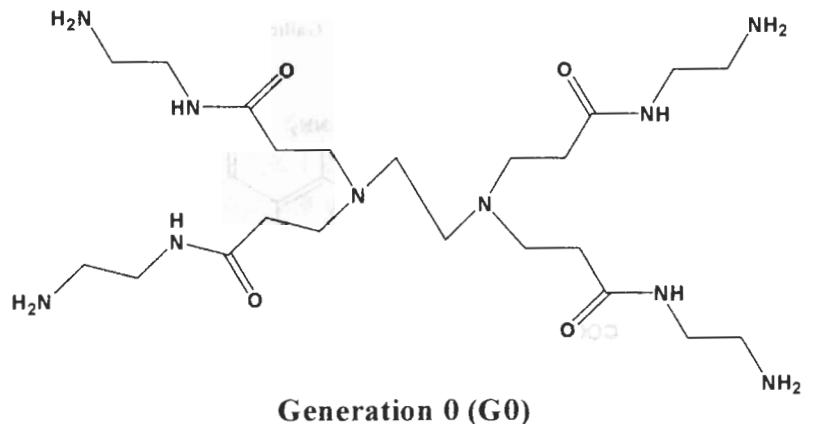


Fig. 1 Poly(amidoamine)dendrimer (PAMAM)

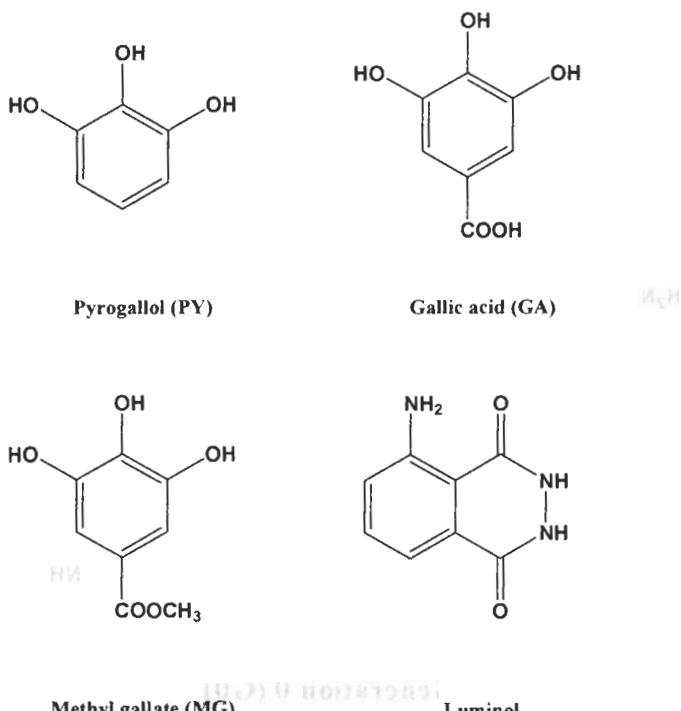


Fig. 2 Polyphenol and luminol

わせて選択する事で様々な機能性デンドリマーの合成が行われている^[12-15]。PAMAMはコアに Ethylenediamine、骨格に N-(2-aminoethyl) acrylamide を持つデンドリマーである。PAMAMは、核酸と安定な複合体を形成して遺伝子を細胞内に効率良く送り込む機能等を持つ事が知られている^[16-18]。また現在、末端のアミノ基の修飾により様々な機能を持つ分子が開発されている^[19, 20]。PAMAMの多世代は外表面部の密度が高くなっている、一種のミセル構造に近い形を形成すると考えられている。今まで様々な増感剤が開発されているが、化学発光物質に対して適用範囲の広い増感剤は見出されていない。そこで、本研究では化学発光物質に対して適応範囲の広い増感剤を見出すことを目的として、Pyrogallol (PY), Methyl gallate (MG), Gallic acid (GA), Luminol の4種の化学発光物質 (Fig.2) を用いてPAMAMによる発光挙動の変化を検討した。PAMAMは最も枝別れの少ない第0世代 (Fig.1) と、1つ枝別れの進んだ第1世代 (Fig.1) を用いた。

2. 実験

2.1 試薬及び装置

PAMAM DendrimerはAldrich社製をMeOHで希釈して用いた。PY, MG 及びGAは水に溶解して0.1 mMとした。Luminolはジメチルホルムアミド(DMF)に溶解し0.1 μMとした。H₂O₂は三菱瓦斯化学製を水で希釈して使用した。水は脱イオン水をMilliQシステム(日本ミリポア社製)で精製したものを、他の試薬は市販の特級品あるいは得られる最上級品を

使用した。化学発光光度計はBerthod社製Lumat LB 9501型ルミノメータを使用した。

2.2 基準操作

0.1 mM の化学発光試薬水溶液 (Luminol は 0.1 μ M DMF 溶液) 200 μ L に PAMAM MeOH 溶液 50 μ L を加えた。20 秒後に NaOH 水溶液 100 μ L を加えた。25 秒間放置後, H₂O₂ 水溶液 100 μ L を自動注入しその後10 分間の積算発光量を計測した。Blank には水または DMF を用いた。

3. 結果及び考察

3.1 PAMAM非存在下におけるpolyphenol及びluminolの化学発光特性

PAMAMによる増感効果を比較するために、PAMAM非存在下における化学発光条件の検討を行った。以下における試薬濃度条件検討の記述における濃度は用いた試薬溶液濃度を示す。

(1) NaOH 濃度の検討

NaOH 濃度 10 mM-1.0 M の範囲でそれぞれ検討した。PY は NaOH 50 mM の時に、MG は NaOH 750 mM の時に、GA 及び Luminol は NaOH 25 mM の時に最大積算発光量を示した。

(2) H₂O₂ 濃度の検討

H₂O₂濃度 0.1-1.0 M の範囲でそれぞれ検討した。MG, GA 及びLuminol の積算発光量は H₂O₂濃度に比例して増加し、H₂O₂ 1.0 M の時に最大積算発光量を示した。PY は H₂O₂ 0.5 M の時に最大積算発光量を示した。

(3) 化学発光特性

PY の発光は H₂O₂注入後 12 秒で最大発光強度を示した後、減少して 2 分後にはほとんど発光を示さなかった。MG 及び GA は H₂O₂注入後 1 秒後で最大発光強度となった後、発光は急速に減少した。Luminol は H₂O₂注入後1 分後で最大発光強度を示した後、発光は緩やかに減少した。

3.2 PAMAM-generation 0 (G0) におけるpolyphenol及びluminolの化学発光特性

(1) PY

NaOH 25-250 mM, H₂O₂ 0.25-1.0 M 及びPAMAM-(G0) 2-50 mM の範囲で条件検討を行った。NaOH 100 mM, H₂O₂ 1.0 M, PAMAM-(G0) 10 mM の時に最大積算発光量を示し、PAMAM非存在下における最大積算発光量の 2.4 倍の増感効果が見られた (Table 1)。この時の PY の化学発光曲線は H₂O₂ 注入後 5 秒まで増加した後、いったん減少した。しかし 15 秒後には再び増加を始め、1 分 30 秒後には最大発光強度を示した。その後の発光の減少は PAMAM 非存在下と比較して緩やかであり、発光時間の著しい延長が見られた。

(2) MG

NaOH 0.1-1.0 M, H₂O₂ 0.1-1.0 M 及びPAMAM-(G0) 10-300 mM の範囲で条件検討を行った。PAMAM-(G0) 濃度の増加とともに積算発光量は増加した。NaOH 750 mM, H₂O₂

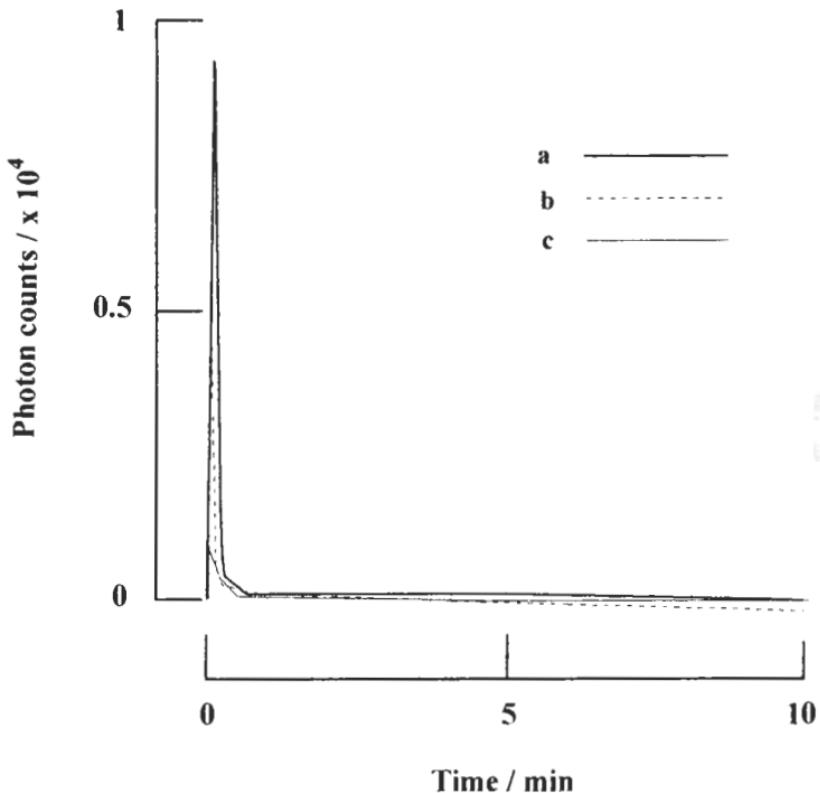


Fig. 3 Time course of CL of MG in the presence of PAMAM.
 Curves : (a) [PAMAM-(G1)] = 100 mM, [NaOH] = 750 mM,
 $[H_2O_2]$ = 250 mM. (b) [PAMAM-(G0)] = 300 mM,
 $[NaOH]$ = 750 mM, $[H_2O_2]$ = 500 mM. (c) $[NaOH]$ = 750 mM,
 $[H_2O_2]$ = 1000 mM.

Table 1 Effect of PAMAM-(G0) and PAMAM-(G1) on the CL development of polyphenol and luminol

Compound	PAMAM / mM		Relative CL intensity ^{a)}	
	G(0)	G(1)	Total photon count	Peak height
PY	10		2.4	0.3
		0.01	0.8	0.7
MG	300		1.3	5.8
		100	2.7	13.5
GA	30		0.7	0.6
		50	1.0	0.5
Luminol	0.001		1.0	0.8
		0.0001	0.7	1.0

a) CL intensity of each compound in the absence of PAMAM was taken as 1.

0.5 M, PAMAM-(G0) 300 mM の時に最大積算発光量を示し, PAMAM非存在下における最大積算発光量の 1.3 倍の増感効果が見られた (Table 1)。この時の MG の化学発光曲線は H_2O_2 注入後 2 秒で最大発光強度を示した (Fig. 3)。

(3) GA

NaOH 10-100 mM, H_2O_2 0.25-1.0 M 及び PAMAM-(G0) 5-50 mM の範囲で条件検討を行った。NaOH 50 mM, H_2O_2 1.0 M, PAMAM-(G0) 30 mM の時に最大積算発光量を示し, これは PAMAM 非存在下における最大積算発光量の 0.7 倍であり増感効果は見られなかった。この時の GA の化学発光曲線は H_2O_2 注入後 1 秒後で最大発光強度を示した。

(4) Luminol

NaOH 10-100 mM, PAMAM-(G0) 1.0 μ M-10 mM の範囲で条件検討を行った (H_2O_2 濃度は 1.0 M)。PAMAM-(G0) 濃度の増加とともに積算発光量は減少した。NaOH 25 mM, PAMAM-(G0) 1.0 μ M の時に最大積算発光量を示し, これは PAMAM 非存在下における最大積算発光量とほぼ等しかった。この時の Luminol の化学発光曲線は H_2O_2 注入後約 1 分で最大発光強度を示した。

3.3 PAMAM-generation 1 (G1) における polyphenol 及び luminol の化学発光特性

(1) PY

NaOH 10-100 mM, H_2O_2 0.25-1.0 M 及び PAMAM-(G1) 10-300 μ M の範囲で条件検討を行った。NaOH 50 mM, H_2O_2 1.0 M, PAMAM-(G1) 10 μ M の時に最大積算発光量を示し, これは PAMAM 非存在下における最大積算発光量の 0.8 倍であり増感効果は見られなかった。この時の PY の化学発光曲線は PAMAM 非存在下の発光曲線と類似していた。 H_2O_2 注入後 6 秒後に最大発光強度を示した後発光は減少しその後再び増加せず, 発光時間の延長は見られなかった。

(2) MG

NaOH 0.1-1.0 M, H_2O_2 0.1-1.0 M 及び PAMAM-(G1) 1.0-100 mM の範囲で条件検討を行った。PAMAM-(G1) 濃度の増加とともに積算発光量は増加した。NaOH 750 mM, H_2O_2 0.25 M, PAMAM-(G1) 100 mM の時に最大積算発光量を示し, これは PAMAM 非存在下における最大積算発光量の 2.7 倍の増感効果が見られた (Table 1)。この時の MG の化学発光曲線は H_2O_2 注入後 2 秒後で最大発光強度を示した (Fig. 3)。

(3) GA

NaOH 10-100 mM, H_2O_2 0.25-1.0 M 及び PAMAM-(G1) 0.5-100 mM の範囲で条件検討を行った。NaOH 50 mM, H_2O_2 1.0 M, PAMAM-(G1) 50 mM の時に最大積算発光量を示し, これは PAMAM 非存在下における最大積算発光量とほぼ等しく増感効果は見られなかった。この時の GA の化学発光曲線は H_2O_2 注入後 1 秒後で最大発光強度を示した。

(4) Luminol

NaOH 10-100 mM, PAMAM-(G1) 0.1 μ M-10 mM の範囲で条件検討を行った (H_2O_2 濃度

は 1.0 M)。PAMAM-(G1) 濃度の増加とともに積算発光量は減少した。NaOH 25 mM, PAMAM (G1) 0.1 μ M の時に最大積算発光量を示し、これはPAMAM非存在下における最大積算発光量の 0.7 倍であった。この時の Luminol の化学発光曲線は H_2O_2 注入後40 秒後で最大発光強度を示した。

4. 結語

本研究によってPAMAM—(第 0 世代) は PY 及び MG に対して、PAMAM—(第 1 世代) は MG に対して増感効果を与える事を見出した。PAMAM—(第 0 世代) は、PY 化学発光の最大積算発光量において 2.4 倍の増感効果を、MG 化学発光の最大積算発光量において 1.3 倍、最大発光強度において 5.8 倍の増感効果を与えた。特に PY の化学発光では著しい発光時間の延長を示した。PAMAM—(第 1 世代) は、MG 化学発光の最大積算発光量において 2.7 倍、最大発光強度において 13.5 倍の増感効果を示した。

一方、GA 及び Luminol の化学発光においてはPAMAM—(第 0 世代)、(第 1 世代) ともに増感効果を示さなかった。特に Luminol ではPAMAM濃度の増加とともに発光量が減少した。この要因として、Luminol の発光体である 2-Aminophthalic acid や GA のカルボキシル基がPAMAM分子中のアミドのカルボニル基及びアミノ基との相互作用による発光の阻害が想定される。

今後、更にPAMAM—(多世代) について検討すると共に、PAMAMの末端のアミノ基の修飾により適用範囲の広い増感剤の開発が期待される。

文 献：

- 1) M. Pazzaglia, J. B. Kim, G. Messeri, G. Martinazzo, F. Kohen, F. Franceschetti, A. Tommasi, R. Salerno and M. Serio, *Clin. Chim. Acta*, **115**, 287 (1981).
- 2) G. C. Zucchelli, A. Pilo, S. Masini, M. R. Chiesa and A. Masi, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **4**, 620 (1989).
- 3) A. Pilo, G. C. Zucchelli, M. Ferdeghini, S. Masini and S. Calvo, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **4**, 185 (1989).
- 4) M. V. Cattaneo and J. H. Luong, *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 424 (1993).
- 5) G. H. G. Thorpe, L. J. Kricka, S. B. Moseley and T. P. Whitehead, *Clin. Chem.*, **31**, 1335 (1985).
- 6) O. Nozaki, X. Ji and L. J. Kricka, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **10**, 151 (1995).
- 7) M. Nakazono, J. Ijichi, Y. Ohba and K. Zaitsu, *Anal. Sci.*, **14**, 853 (1998).
- 8) M. Kato, M. Yamada and S. Suzuki, *Anal. Chem.*, **56**, 2529 (1984).
- 9) H. Karatani, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **60**, 2023 (1987).
- 10) D. I. Metelitz, A. N. Eryomin and V. A. Shibaev, *J. Biolumin. Chemilumin.*, **7**, 21 (1992).
- 11) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder and P. Smith, *Polymer Journal*, **17**, 117 (1985).

リチウム電池用ゲルポリマー電解質の熱安定性

九州大学大学院総合理工学府 *九州大学機能物質科学研究所

川村 哲也, *江頭 港, *渡辺 泉, *岡田 重人, *山木 準一

The thermal stability of gel polymer electrolytes for lithium batteries

Tetsuya Kawamura,

*Minato Egashira, *Izumi Watanabe, *Shigeto Okada, and *Jun-ichi Yamaki

Interdisciplinary Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University

*Institute of Advanced Material Study, Kyushu University

たなみ

Abstract

A thin film was made from PVdF and HFP powder and 1M LiN_{(SO₂CF₃)₂}/EC+DMC (1:1 in vol.) electrolyte was soaked into the film to obtain gel polymer electrolyte for lithium batteries. The thermal stability of the gel polymer electrolyte with/without Li metal or Li_{0.36}CoO₂ was measured by DSC. The gel polymer electrolyte with Li metal was stable up to 250 °C that temperature is higher than that of liquid electrolyte(stable up to 180 °C). The exothermic reaction of the gel polymer electrolyte with Li_{0.36}CoO₂ started at higher temperature than that of liquid electrolyte, however the calorific value of the gel polymer electrolyte with Li_{0.36}CoO₂ was larger than that of liquid electrolyte with Li_{0.36}CoO₂.

1. 序 論

1975年に世界ではじめて poly (acrylonitrile) (PAN)と poly (methyl methacrylate) (PMMA)を用いたリチウムポリマー電池がFeulladeとPercheによって紹介された¹⁾。リチウムポリマー電池は、現在市販され携帯電気機器に幅広く使用されているリチウム電池と同じ正負極活性物質を用い、原理的にはリチウム電池と同じである。これまでの電池と大きく違う点は、電解質としてゲル状の固体電解質を用いる点である。電解質が固体になったことにより、漏液の心配がなくなった。また、漏液の心配がなくなったことで、柔らかく曲げられるシート状の電池が開発可能となった。このように、リチウムポリマー電池は「電池」の更なる可能性を広げた。

リチウムポリマー電池が開発されてすぐに、リチウムポリマー電池の電解質として用いられるゲルポリマー電解質のマトリクスピリマーとして、丈夫で化学的に安定なPoly(vinylidene fluoride) (PVdF)が注目された。PVdFは電子求引基(-C-F)を有しているので

陽極に対してかなり安定だと思われる²⁾。実際、PVdFはリチウム対極で5Vから-0.2Vまで安定であることが報告されている³⁾。また、PVdFはポリマーとしてかなり大きな誘電率を有している($\epsilon = 8.4$)。このことは、ゲルポリマー電解質中のリチウム塩の電離の手助けになると思われる²⁾。リチウム塩の電離が進むと電荷移動媒体がそれだけ増加しイオン伝導度が増すことになるからである。しかしPVdFは結晶化しやすく多くの溶媒を含有できないという欠点があった⁴⁾。そこで、GozdzやTarasconらはPVdFとhexafluoropropylene(HFP)を混ぜたポリマーマトリクスを製作した⁵⁾。HFPの添加により、ポリマーの結晶性が低下するのである⁶⁾。その結果、PVdF-HFPは液体の電解液を多量に含むことができるアモルファス領域と、機械的強度を有する結晶領域を持つハイブリッドポリマーとなつた⁵⁾。PVdF-HFPと、可塑剤に電解液を用いてゲルポリマー電解質を作成した結果、polyethylene oxide(PEO)やPAN、PMMAよりも機械的強度が優れており^{4, 5)}、PVdFより溶媒保持力が優れていた⁶⁾。また、PVdF-HFPのゲルポリマー電解質を用いてリチウム金属負極の電池を組んだところ、リチウムデンドライトの成長がおさえられた。また、サイクル特性も、PEOを用いた電池より良好であり、導電率もPEOの2倍の値を示した。これは、HFPにある-CF₃基の還元物質であるLiFがリチウム金属上に保護膜を生成したためと考えられる⁷⁾。

現在、ゲルポリマー電解質を電気自動車(EV)用電源として用いるための研究がなされている⁸⁾。そのためには電池の大型化が不可欠であるが、それにはクリアしなければならない課題がある⁹⁾。以下にその課題を示す。

- i) リチウム電池の電極における酸化還元に対して電気化学的に安定であること。
- ii) 液状の電解液との適合性があること。これは、十分なイオン伝導性、十分なLi⁺イオンの輸率があること。
- iii) 容易に製造できること。
- iv) 機械的強度が優れていること。

v) ショートさせたりや熱したりする劣悪な環境においても、熱安定性が優れていること。

PVdF-HFPを用いたゲルポリマー電解質について上に挙げた点に着目してみた。i)については、PVdF-HFPを用いたゲルポリマー電解質は、上で述べたとおり十分な電位窓を有しており、リチウム金属に対しても安定な保護膜を作る。ii)については、PVdF-HFPを用いたGPEは液状の電解液よりも劣るが、常温ではPMMAやPANを用いたゲルポリマー電解質よりもイオン伝導性は優れている。低温特性も液状の電解液と変わらない¹⁰⁾。iii)については、PVdF-HFPを用いたゲルポリマー電解質の製造方法は幾つかあるが、大気中でも簡単に製作できる¹¹⁾。iv)については、上で述べたように良好な機械的強度を有している。v)については、PEOを用いたゲルポリマー電解質についてはリチウム金属共存下の熱安定性について示差走査熱量計(DSC)を用いて測定され、ゲルポリマー電解質が液状の電解液よりも熱安定性が良いと報告されている¹²⁾。しかし、PVdF - HFPを用いたゲルポリマー電解質については、あまり熱安定性について研究が行われていない。

そこで我々は、PVdF-HFPを用いたゲルポリマー電解質を作成し、ゲルポリマー電解質単独の熱安定性や、リチウム金属共存下のゲルポリマー電解質の熱安定性、正極活物質共

存下のゲルポリマー電解質の熱安定性をDSCを用いて調べ、考察を行った。

2. 実験

2.1 試薬及び装置

ゲルポリマー電解質のポリマーマトリクス作成にはPVdF94wt.%+HFP6wt.%の粉末(クレハ#2100, 固有粘度1.5)を使用した。また、ポリマー粉末を溶かす溶剤として、アセトン(和光純薬工業)を使用した。また、作成したポリマーには1M LiN $(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ /EC: DMC (1:1 in vol.)電解液(富山薬品)を含有させた。

充放電装置にはNAGANO, BTS2004を使用した。インピーダンス測定装置にはHIOKI, 3522LCR, HITESTERを使用し、DSC測定装置にはRIGAKU, Thermo plus, TG8110を使用した。

2.2 ゲルポリマー電解質(GPE)の作成

PVdF+HFPの粉末とアセトンを重量比1:6で混ぜ、熱しながら24時間攪拌した。均一になった混合液をガラス板上にキャストし1週間大気中室温で乾燥させた。その後24時間真空乾燥し、厚さ110μmのポリマー薄膜を得た。作成したポリマー薄膜を1M LiN $(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ /EC:DMC (1:1 in vol.)電解液にグローブボックス中で48時間浸してゲルポリマー電解質を作成した。GPE中の電解液の含有量は30wt%であった。

2.3 充放電試験とインピーダンス測定

実験にはコインセル2032を使用した。膜状のコポリマーをくりぬき、直径15mmの円形のコポリマーを得た。それを、1M LiN $(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ /EC:DMC(1:1 in vol.)電解液に48時間浸しゲルポリマー電解質を得た。両極にリチウム金属を使用し、Li/gel polymer electrolyte/Liのノンブロッキングセルを作成した。充放電試験は電流密度0.1mA/cm²で100サイクル行った。インピーダンス測定は充放電試験で用いたセルの充放電前と100サイクル後に行った。電流レートは0.01mAh、電圧は10mV、周波数は0.1Hz~95000Hzで測定した。

2.4 DSC測定

ゲルポリマー電解質単独及びリチウム金属負極共存下の熱安定性を、ステンレス製耐圧密閉容器に試料を封入しDSC装置を用いて測定した。また、比較のために、1M LiN $(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ /EC+DMC(1:1 in vol.)電解液を用いて同様の実験を行った。

コバルト酸リチウムを、硫酸を用いて化学的に脱リチウムして^{10,11)}, Li_{0.36}CoO₂を合成した。Li_{0.36}CoO₂共存下のゲルポリマー電解質の熱安定性を、DSC装置を用いて評価した。また、比較のために1M LiN $(\text{SO}_2\text{CF}_3)_2$ /EC+DMC(1:1 in vol.)電解液を用いて同様の実験を行った。全ての試料はアルゴン雰囲気グローブボックス中でDSC測定用ステンレス製耐圧密閉容器に封入した。

3. 結果と考察

3.1 ゲルポリマー電解質の充放電試験とインピーダンス測定

Fig.1はLi/gel polymer electrolyte(GPE)/Liセルの充放電試験の結果である。充放電開始直後から25サイクル後まで電圧は大きく変動し安定しなかった。これは、リチウム金属とゲルポリマー電解質の界面の接触が不良であったためと思われる。また、25サイクル以降はほぼ一定の電圧でサイクルしている。これはリチウム金属電極上のリチウムの溶解析出を繰り返すうちにリチウムデンドライドが成長し、ゲルポリマー電解質とリチウム金属の接触が改善されたためであると考えられる。PVdF-HFPをポリマーマトリクスとして用いたゲルポリマー電解質をセルに使用し充放電を繰り返してもリチウム金属負極上にリチウムデンドライドが成長しない事が報告されている⁷⁾が、我々の用いたゲルポリマー電解質はポリマーマトリクスを先に作成しそれから電解液を含有させているので多孔質セパレーターと性質が似ている。そのため、ゲルポリマー電解質の多孔質の表面の孔の部分でリチウムデンドライドが成長すると理解できる。また、サイクルが安定した理由としてリチウム金属上にイオン伝導性を有するLiFのような保護膜(Solid electrolyte interphase:SEI)が生成⁷⁾したことの一因と考えられる。

Fig.2は充放電試験で用いたセルのサイクル前と100サイクル後のインピーダンス測定の結果である。半円が一つ見られる。原点と、半円とx軸との小さい値の交点の間がゲルポリマー電解質の抵抗を示し、半円とx軸との二つの交点の間がリチウム金属上の不動態層(SEI)の抵抗を示している⁸⁾。サイクル前のゲルポリマー電解質の抵抗は約150Ωであったが100サイクル後では抵抗は約50Ωにまで減少した。これは、上で述べたとおり多孔質のゲルポリマー電解質の表面の孔の部分に沿ってリチウムデンドライドが成長し、両電極間の距離が縮まったためと思われる。また、ゲルポリマー電解質はコインセル中でばねによって圧力をかけられている。そのため、時間が経つにつれねの圧力によってゲルポリマー電解質が縮み、両電極間の距離が減少したとも考えられる。一方SEIの抵抗は、サイクル前の約1100Ω抵抗が、100サイクル後では700Ωとなり、かなり小さくなった。サイクル前のリチウム金属上のSEIはリチウムアルキルカーボネートが主成分である¹⁰⁾が、100サイ

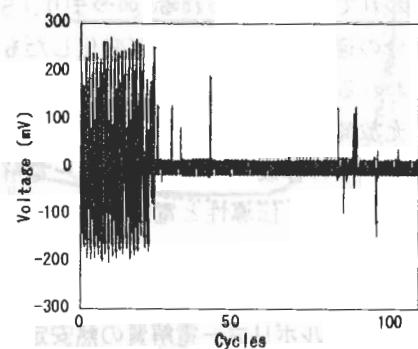


Fig. 1. Charge-discharge profile by using Li/gel polymer electrolyte/Li cell

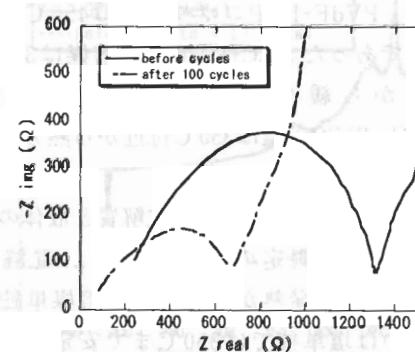


Fig. 2. Impedance spectrum observed with Li/gel polymer electrolyte/Li cell before cycle and after 100 cycles

クル後にはリチウム金属とゲルポリマー電解質の界面はHFPの還元物質であるLiFで覆われていると思われる⁷⁾。つまり、SEIの成分の違いによって抵抗が変化したものと思われる。

充放電試験とインピーダンス測定の結果、我々の作成したゲルポリマー電解質は十分なイオン伝導性と電解液保持能力を有していることが確認された。

3.2 ゲルポリマー電解質の熱安定性

Fig.3はゲルポリマー電解質構成材料であるPVdF-HFPコポリマーとEC+DMC混合溶媒とLiN(CF₃SO₂)₂塩のDSC測定の結果である。PVdF-HFPコポリマーは450℃まで安定であった。EC+DMC混合溶媒は350℃付近から緩やかに発熱した。固体のLiN(CF₃SO₂)₂塩は350℃付近から熱分解が始まった。

Fig.4はゲルポリマー電解質と液体の電解液のDSC測定の結果である。電解液は300℃から発熱が始まった。溶媒単独、あるいは塩単独では350℃まで安定であったことから、この発熱は、LiN(SO₂CF₃)₂とEC+DMCの反応に起因すると考えられる。ゲルポリマー電解質では310℃から発熱が開始した。液体の電解液とゲルポリマー電解質では発熱開始温度に大きな違いはみられなかった。

3.3 リチウム金属共存下のゲルポリマー電解質の熱安定性

Fig.5はPVdF-HFPコポリマー単独でDSC測定を行った結果と、リチウム金属をPVdF-HFPコポリマーに密着させてDSC測定を行った結果である。リチウム金属共存下のコポリマーのDSC曲線で見られる180℃の吸熱ピークはリチウム金属の融解に起因するピークである。また、二つのDSC曲線の比較から、リチウム金属とPVdF-HFPコポリマーは350℃以上で発熱して反応すると考えられる。

Fig.6はリチウム金属共存下のゲルポリマー電解質(GPE)とリチウム金属共存下の液体の電解液のDSC曲線である。二つのDSC曲線で見られる180℃の吸熱ピークはリチウム金

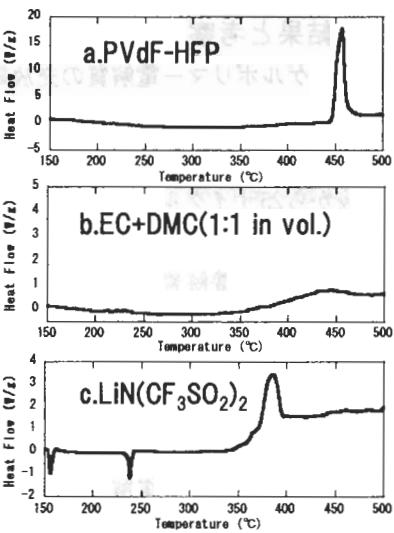


Fig. 3. DSC profiles of PVdF-HFP, EC+DMC(1:1 in vol.) and LiN(CF₃SO₂)₂

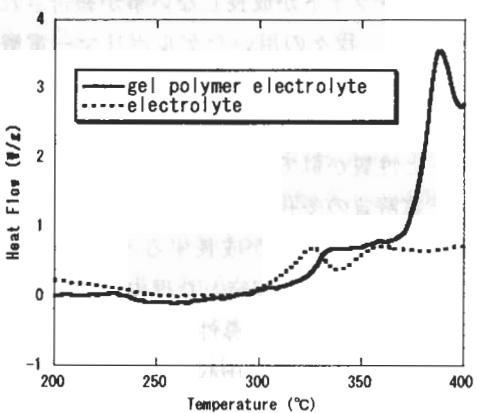


Fig. 4. DSC profiles of gel polymer electrolyte and liquid electrolyte

属の融解に起因するピークである。液体の電解液ではリチウム金属の融解直後から大きな発熱が観察された。一般に有機電解液にリチウム金属が接触するとリチウム金属上に電解液の還元物質であるリチウムアルキルカーボネートなどがSEIとして堆積する^[2]。そしてこのSEIはそれ以上の有機電解液とリチウム金属の反応を抑える。Fig. 6のリチウム金属共存下の液体の電解液の場合も最初はリチウム金属上にSEIが形成されていたが、180°Cでリチウム金属が融解すると、リチウム金属を覆っていたSEIも崩壊し電解液とリチウム金属が直に接触し発熱反応したものと考えられる。一方、ゲルポリマー電解質では、リチウム金属融解直後に発熱は観察されず、370°Cで発熱ピークが見られた。このことから、ポリマーマトリクスとリチウム金属の反応によってリチウム金属とゲルポリマー電解質の界面に強固なSEIが形成された可能性が考えられる。実際、PVdF-HFPを用いたゲルポリマー電解質を用いて充放電を繰り返すとリチウム金属上にHFPの還元物質と思われるLiFのような保護膜が形成されることが報告されている^[3]。熱を加える今回の実験でも同様に、リチウム金属とゲルポリマー電解質の界面にLiFの保護膜が形成されたと考えられる。LiFは無機物でイオン結合性化合物であるので、リチウムアルキルカーボネートなどの有機化合物と違い、熱をかけても分解しにくく強固なSEIになると思われる。また、リチウム金属共存下のゲルポリマー電解質のDSC曲線で、370°Cと430°Cと465°Cに発熱ピークが観察された。370°Cの発熱ピークはリチウム金属とポリマーの反応に起因するピークで、465°Cの発熱ピークはポリマーの分解反応に起因するピークと考えられる。430°Cの発熱ピークは同定することが出来なかった。

3.4 Li_{0.36}CoO₂共存下の熱安定性

リチウムポリマー電池の正極活性物質として用いられるコバルト酸リチウムの、化学的に不安定になる過充電状態の組成に対応するLi_{0.36}CoO₂を合成し、Li_{0.36}CoO₂共存下のゲルポリマー電解質の熱安定性を調べることを試みた。

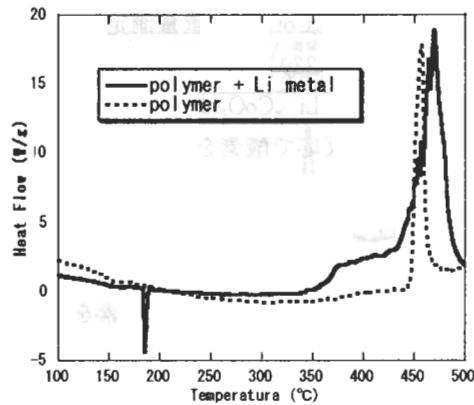


Fig. 5. DSC profiles of PVdF-HFP polymer with/without lithium metal

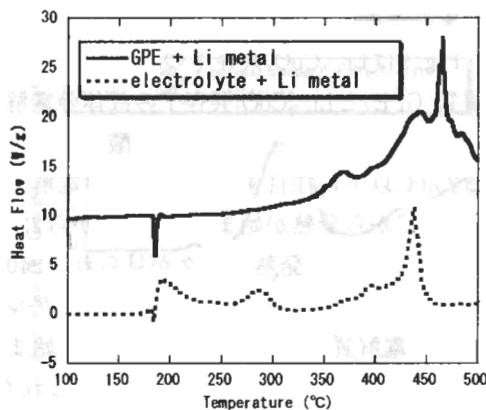
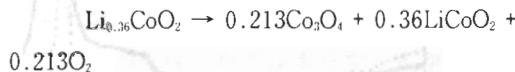


Fig. 6. DSC profiles of gel polymer electrolyte and liquid electrolyte with lithium metal

Fig.7は $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ の熱重量測定(TG測定)の結果である。230°Cから急激な重量の減少が観察された。 $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ は熱を加えた場合、以下のような反応で酸素を放出して分解すると考えられる^{10,11)}。



つまり $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ は230°Cで酸素を放出して分解すると考えられる。

Fig.8は $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下のPVdF-HFPコポリマーのDSC曲線である。PVdF-HFPは300°C付近から発熱反応が開始した。このことから、PVdF-HFPは300°C以上で酸素と反応すると考えられる。

Fig.9は $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下のゲルポリマー電解質(GPE)と $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下の液体の電解液のDSC曲線である。 $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ が酸素を放出する250°C以下に注目すると、液体の電解液では170°Cから発熱が始まり、200°Cから220°Cの間で緩やかな発熱ピークが見られ、240°Cで発熱はそのまま終了している。一方ゲルポリマー電解質では、220°Cから発熱が始まると230°Cで鋭く大きな発熱ピークがみられた。250°C以下の発熱量は $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 重量当たり電解液が1100J/gに対しゲルポリマー電解質は1500J/gであった。

$\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下のゲルポリマー電解質の230°Cにおける大きな発熱にPVdF-HFPが関与しているか調べるために、つまり物理的原因か化学的原因か調べるために、ゲルポリマー電解質に成形する前の粉末状のPVdF-HFPを用いてFig.9と同じ実験を行った。Fig.10は、粉末状のPVdF-HFPに1M LiN(CF_3SO_2)₂/EC+DMC(1:1 in vol.)電解液を混ぜて $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下でDSC測定を行った結果と、液体の電解液を $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下でDSC測定を行った結果である。粉末状のポリマーを刪いた繩織、230°C付近にFig.9でみられたような大きな発熱ピークは観察されなかった。

以上の結果から、 $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下の電解液では酸素放出前から $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 表面上で

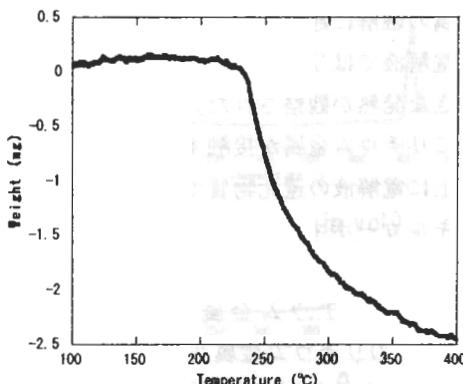


Fig. 7. TG profile of $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$

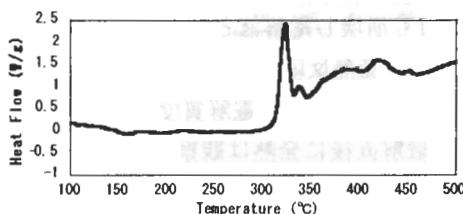


Fig. 8. DSC profile of PVdF-HFP polymer with $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$

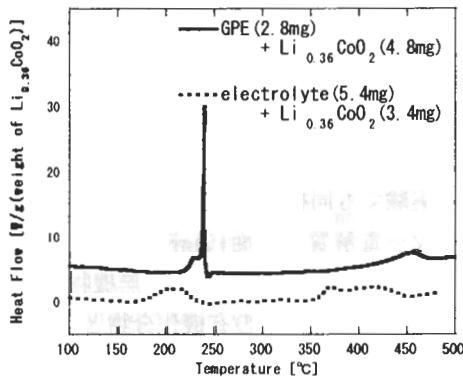


Fig. 9. DSC profiles of gel polymer electrolyte and liquid electrolyte with $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$

$\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ と電解液が反応したと考えられる。そして、 $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ から酸素が放出される230°C付近では反応はほとんど終了した。一方、ゲルポリマー電解質では、含有されている電解液と $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ の接触がポリマーマトリクスにより抑えられ、液体の電解液のように230°C以下で $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 表面上で反応することはなかったが、 $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ から酸素が放出されると一気にポリマーマトリクス内に含有された電解液と酸素が反応し大きな発熱を示したものと考えられる。

3.5 $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下の1M LiN (CF_3SO_2)₂/γ-butyrolactone (GBL)と 1M LiN (CF_3SO_2)₂ / propylene carbonate (PC) の熱安定性

Fig. 9で観察された230°Cにおけるゲルポリマー電解質の大きな発熱ピークが、内包された電解液の塩の発熱に起因するのか溶媒の発熱に起因するのか調べるために、実験2.2のように作成したポリマー薄膜を電解液に浸漬させず、EC+DMC(1:1 in vol.)混合溶媒に浸漬させ特殊なゲルポリマー薄膜を作成した。そして、その薄膜を用いて $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下でDSC測定を行った。Fig.11は、 $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下のEC+DMC(1:1 in vol.)混合溶媒含有したポリマー薄膜のDSC曲線と、 $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$ 共存下

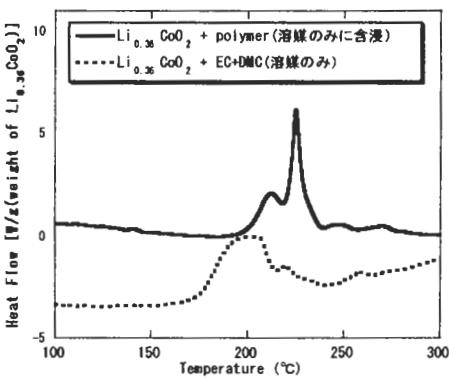


Fig. 10. DSC profiles of polymer that include EC+DMC and EC+DMC with $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$

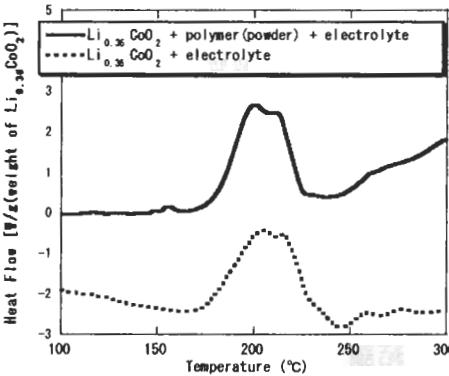


Fig. 11. DSC profiles of powdered PVdF-HFP + liquid electrolyte and liquid electrolyte with $\text{Li}_{0.36}\text{CoO}_2$

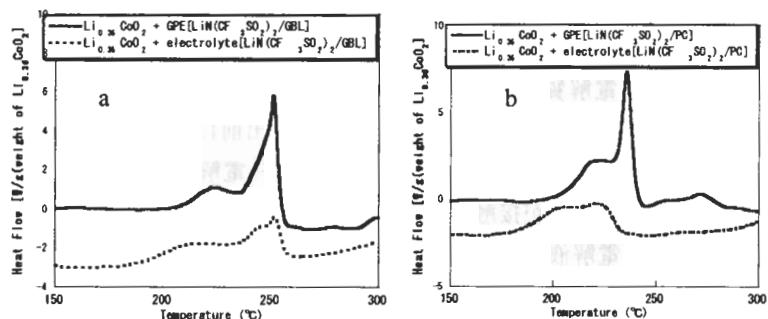


Fig. 12. a is DSC profile of gel polymer electrolyte that include 1M $\text{LiN}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2/\gamma$ -butyrolactone. b is DSC profile of gel polymer electrolyte that include 1M $\text{LiN}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2$ /propylene carbonate.

の液体のEC+DMC(1:1 in vol.)混合溶媒のDSC曲線である。液体のEC+DMCでは230℃付近に大きな発熱は観察されなかったが、ポリマー薄膜では230℃付近に鋭い大きな発熱ピークが観察された。以上の結果からLi_{0.36}CoO₂共存下のゲルポリマー電解質の230℃の大きな発熱ピークはゲルポリマー電解質に内包されたEC+DMCの溶媒に起因するものと結論付けた。

次に我々は、230℃の大きな発熱を生じない電解液を探査した。Fig.12aはLi_{0.36}CoO₂共存下における1M LiN(CF₃SO₂)₂/γ-butyrolactone(GBL)電解液を含有させたゲルポリマー電解質のDSC曲線と、Li_{0.36}CoO₂共存下における1M LiN(CF₃SO₂)₂/γ-butyrolactone(GBL)のDSC曲線である。また、Fig.12bは、Li_{0.36}CoO₂共存下における1M LiN(CF₃SO₂)₂/propylene carbonate(PC)電解液を含有させたゲルポリマー電解質のDSC曲線と、Li_{0.36}CoO₂共存下における1M LiN(CF₃SO₂)₂/propylene carbonate(PC)電解液のDSC曲線である。両方のゲルポリマー電解質で230℃付近に大きな発熱ピークが観察されたが、GBLを用いたゲルポリマー電解質の発熱ピークは250℃にみられ、PCやEC+DMCを用いたゲルポリマー電解質よりも20℃ほど高い温度であった。これは、GBLの方がPCより酸素との反応性が小さいことを示している。また、発熱ピークの大きさは両ゲルポリマー電解質ともEC+DMCを用いたゲルポリマー電解質より小さかった(Fig.9,12)。また、液体の1M LiN(CF₃SO₂)₂/GBL電解液において、250℃にゲルポリマー電解質と同じ温度で、小さいがやや鋭い発熱ピークがみられた。これは、GBLの反応性が小さいため、Li_{0.36}CoO₂表面上でGBLとLi_{0.36}CoO₂の反応が進まず、Li_{0.36}CoO₂の酸素放出後まで多量の未反応電解液が残存し、その結果放出された酸素と未反応電解液が一気に反応したためと考えられる。この結果は3.4章の結論と矛盾しない。

4. 結論

PVdF-HFPコポリマーを用いてゲルポリマー電解質を作成し、その電解質の熱安定性について調べた。その結果、電解液とゲルポリマー電解質では発熱開始温度に大きな違いは見られなかったりチウム金属共存下におけるゲルポリマー電解質の熱安定性について調べた。その結果、ゲルポリマー電解質では、電解液と比べて、発熱が抑えられる事が分かった。これは、ポリマーとリチウム金属の反応生成物が電解液とリチウム金属の反応を妨げたためと考えられる。Li_{0.36}CoO₂共存下のゲルポリマー電解質の熱安定性について調べた。その結果、ゲルポリマー電解質において、電解液では見られなかった大きな発熱が230℃という低温域で見られた。電解液ではLi_{0.36}CoO₂の酸素放出前にLi_{0.36}CoO₂表面上でLi_{0.36}CoO₂と電解液がほとんど反応してしまうのに対しゲルポリマー電解質ではポリマーマトリクスが内包された電解液とLi_{0.36}CoO₂が接触するのを妨げる。そのためLi_{0.36}CoO₂が酸素を放出すると、酸素と内包された電解液が一気に反応し、大きな発熱を示したものと考えられる。

5. 参考文献

- 1) G. Feullade, Ph. Perche, J. Appl. Electrochem., 5 (1975) 63.
- 2) J.Y. Song, Y.Y. Wang, C.C. Wan, J. Power Sources, 77 (1999) 183.

- 3) T. Michot, A. Nishimoto, M. Watanabe, *Electrochimica Acta*, **45** (2000) 1347.
- 4) C.S. Kim, S.M. Oh, *Electrochimica Acta*, **46** (2001) 1323.
- 5) J.M. Tarascon, A.S. Gozdz, C. Schmutz, F. Shokoohi, P.C. Warren, *Solid State Ionics*, **86-88** (1996) 49.
- 6) A.D. Pasquier, P.C. Warren, D. Culver, A.S. Gozdz, G.G. Amatucci, J.M. Tarascon, *Solid State Ionics*, **135** (2000) 249.
- 7) T. Osaka, M. Kitahara, Y. Uchida, T. Momma, K. Nishimura, *J. Power Sources*, **81-82** (1999) 743.
- 8) P. Baudry, S. Lascaud, H. Majastre, D. Bloch, *J. Power Sources*, **68** (1997) 432.
- 9) S. Izuchi, S. Ochiai, K. Takeuchi, *J. Power Sources*, **68** (1997) 37.
- 10) J.R. Dahn, E.W. Fuller, M. Obravac, U. van Sacken, *Solid State Ionics*, **69** (1994) 265.
- 11) Y. Baba, S. Okada, J. Yamaki, *Solid State Ionics*, **148** (2002) 311.
- 12) T. Kawamura, A. Kimura, M. Egashira, S. Okada, J. Yamaki, *J. Power Sources*, **104** (2002) 260.

せいで水

止水

電池の充電と放電の電流測定による電池の品質評価法は電池の電気特性を大まかに示すもの
電池の充電と放電の電流測定による電池評価

乳酸菌バクテリオシンを利用するバイオプリザベーション

¹九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門,

²オーム乳業(株), ³(株)やまやコミュニケーションズ

善藤 威史¹, 島田 信也², 谷本 保英²,

相馬さやか³, 中山 二郎¹, 園元 謙二¹

Biopreservation using bacteriocins from lactic acid bacteria

Takeshi Zendo¹, Shinya Shimada², Yasuhide Tanimoto²,

Sayaka Soma³, Jiro Nakayama¹, Kenji Sonomoto¹

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University,

²Omu Milk Products Co., Ltd., ³YAMAYA COMMUNICATIONS, INC.

Abstract

Biopreservation is a new technique to preserve foods by using food-origin antimicrobials, termed biopreservatives. Among various biopreservatives one of the most promising substances is the bacteriocin produced by lactic acid bacteria. We have developed new applications of a bacteriocin, nisin Z produced by *Lactococcus lactis*, to control spore-forming bacteria (*Bacillus subtilis*). Nisin Z acted synergistically with L-alanine, a germination-inducing substance, which decreased spore-forming bacteria. Nisin Z also had synergistic effects with CaCl₂ on *B. subtilis* spores. The combination of nisin Z and L-alanine or nisin Z and CaCl₂ led to preferable koji fermentation, which is liable to be contaminated by *B. subtilis*. Bacteriocin in combination with other bacteriocins, conventional antimicrobials, and physical treatments is expected to inhibit undesirable bacteria more effectively.

1. バイオプリザベーション

嗜好が多様化した現代では、本来の風味を保ちながらも、安全性の高い食品が求められている。食品あるいは中間原料中の有害微生物を制御する最も一般的な手段は加熱処理であるが、過度の加熱は食品等の品質を大きく損なう。消費者の生鮮・高品質化志向に応え、かつ安全性の高い食品を供給するには、より穏和な条件での殺菌・保存処理法の確立が望まれる。そこで、人々が長年にわたり食品として、あるいは食品とともに、何らの害作用もなしに食べてきた植物・動物あるいは微生物起源の抗菌物質（バイオプリザバティブ）を利用した保存法，“バイオプリザベーション”が注目を集めている。¹⁾

発酵によって食品の保存性を高める方法は、バイオプリザベーションの最も典型的な例である。特に乳酸菌は、さまざまな発酵食品の製造に深く関わっていることが知られており、近年、乳酸菌が競合微生物の排除、すなわち食品の腐敗防止や発酵食品の安定したマイクロフローラの形成に関与していることが明らかとなってきた。乳酸菌は、乳酸などの有機酸をはじめ、さまざまな増殖阻害物質を生産するが、そのなかでもバイオプリザバティブとして最も大きな期待を寄せられているのが、タンパク質性の抗菌物質、バクテリオシンである。

2. 乳酸菌が生産するバクテリオシン

乳酸菌が生産するバクテリオシンは、熱安定性に優れ、無味無臭で食品のフレーバーに影響を与えない。乳酸菌が古来より食品とともに日常的に摂取されてきたことや、乳酸菌バクテリオシンはヒトの消化酵素により分解されることから、乳酸菌バクテリオシンの安全性は非常に高いと考えられる。このように優れた特性をもつ乳酸菌バクテリオシンは、従来の抗菌剤に代わる夢の抗菌物質として現代社会の要請に応えるものであろう。

乳酸菌バクテリオシンは、一般に生産菌に近縁のグラム陽性菌に対して抗菌活性を示し、標的細胞膜への孔形成によって殺菌的に作用する。リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、セレウス菌 (*Bacillus cereus*) などの食中毒菌に対して抗菌活性を持つものが多く、これらの胞子の発芽を抑制するものも存在する。

乳酸菌バクテリオシンはこれまでに数多く報告されており、それらは構造などを基に、大きくクラスIからIVまでの4つに分類される (Table 1).^{2,3)} クラスIは、ランチビオティックとも呼ばれ、不飽和アミノ酸、ランチオニン、3-メチルランチオニンなどの異常アミノ酸を含む耐熱性の低分子ペプチド (<5 kDa) である。唯一GRAS (Generally Recognized As Safe) 物質として認められているバクテリオシン、ナイシンA (Fig. 1) はこのクラスIに属する。クラスIIは、異常アミノ酸を含まない耐熱性の低分子ペプチド (<10 kDa) で、以下のようなサブクラスが存在する。クラスIIaは、N末端側にコンセンサス配列 (-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-) を持つ抗リステリアペプチドで、ナイシンAに次いで実用化

Table 1. Classification of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.

Class	Characteristics	Representative bacteriocins
I	Lantibiotics, small (< 5 kDa) heat-stable peptides containing unsaturated amino acids, lanthionine and 3-methyllanthionine	Nisin A, nisin Z, lacticin 481, lactocin S
II	Small (< 10 kDa) heat-stable peptides formed by unmodified amino acids	
IIa	Anti-listerial peptides with a consensus sequence of YGNGVXC in N-terminal	Pediocin PA-1, sakacin A, enterocin A, mundicin, leucocin A
IIb	Two-peptide bacteriocins: two different peptides required to form an active poration complex	Lactococcin G, lactococcin M, lactacin F, plantaricin E/F
III	High-molecular-weight (> 30 kDa), heat-labile proteins	Helveticin J, helveticin V-1829, lacticin A, acidophilicin A,
IV	Complex bacteriocins containing lipid or carbohydrate moieties	Plantaricin S, leuconocin S, lactocin 27, pediocin SJ-1

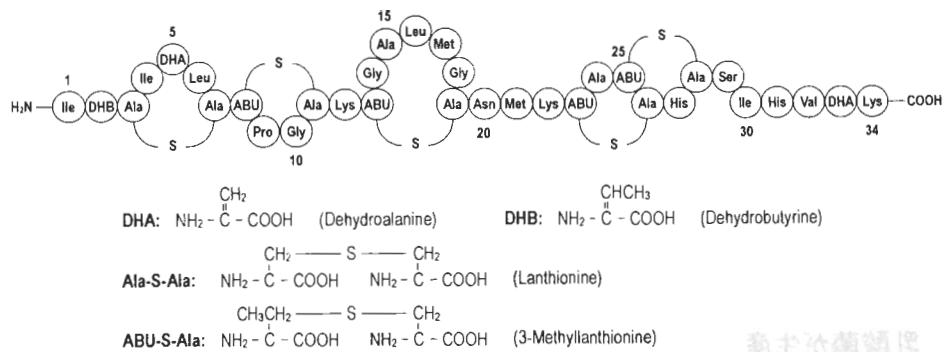


Fig. 1. Structure of nisin A. Nisin Z differs in a single amino acid residue at position 27 (His in nisin A and Asn in nisin Z).

が期待されるペディオシンPA-1が代表的である。クラスIIbバクテリオシンは、2分子のペプチド複合体を形成して抗菌活性を示す。クラスIIIは、熱感受性の高分子タンパク質(>30 kDa), クラスIVは、タンパク質分子以外(糖質や脂質)と複合体を形成して抗菌活性を示すものとして分類される。これまでに報告されているバクテリオシンの多くは、クラスI, またはクラスIIに属している。クラスIIIとIVのバクテリオシンの報告は少なく、クラスIVに至っては精製すら完了しておらず、それらの詳細は明らかとなっていない。

乳酸菌のバクテリオシンは、しばしば抗生物質と混同されるが、両者の間にはさまざまな違いがある。食品への安全性の面からもこの違いは明確にする必要がある。乳酸菌のバクテリオシンは、一般のタンパク質と同様にリボソームで合成されるペプチド、もしくはタンパク質であり、消化管の酵素で分解され、消化管の微生物叢に影響を与える。抗生物質が比較的狭いため、有用菌のみを選択的に生かすことも可能である。

一方、抗生物質は、多くのものはタンパク質性ではなく、消化管の酵素では分解されない。しかも、抗生物質が広いため、消化管の微生物叢に悪影響を及ぼす可能性があり、胃腸障害などの副作用をもつものも多い。さらに、大半の抗生物質は食品に無関係の微生物によって生産されることも乳酸菌のバクテリオシンとの大きな違いである。以上のように、乳酸菌のバクテリオシンは抗生物質とは異なり、安全な食品保存料として望ましい特性を備えていると言えよう。

乳酸球菌*Lactococcus lactis*が生産するバクテリオシン、ナイシンAは、欧米を中心に世界50ヶ国以上で缶詰、チーズ、マヨネーズなどの食品保存料として広く利用されている。現在までに、日本ではバクテリオシン精製物の食品添加物としての利用は認められていないが、ナイシンAについては厚生労働省が食品添加物としての指定を検討中である。現状でも、バクテリオシン生産乳酸菌のスターターカルチャーとしての利用や培養上清の発酵調味液としての利用は可能であり、今後、日本においても、乳酸菌バクテリオシンの需要が急速に高まることが予想される。

3. 新しいバクテリオシン利用方法の開拓

我々はこれまで、新奇バクテリオシン産生乳酸菌の検索・同定、バクテリオシンの精製と構造および遺伝子解析、特性の検討、発酵生産の最適化、連続生産バイオリアクターの開発、などについて取り組んできた。⁴⁾また、产学官より成る「機能性食品製造プロセス開発チーム」を作り、バクテリオシンの食品製造プロセスあるいは食品への応用について、構成メンバーの特徴を生かした研究項目に取り組み、顕著な研究成果を得ることができた。⁵⁾

このような产学官共同研究の成果をさらに発展させるために、関連企業数社を含む「九州大学新生理活性ペプチド事業準備室」を発足させ、ナイシンZなどさまざまなバクテリオシンの実用化研究を展開中である。例えば、ナイシンZの製造に関しては、現在、1日当たり3,000 lの発酵液を調製し、限外ろ過による除菌、ナノろ過による濃縮で、ナイシンZ濃縮液(10,000 U/ml) 1,000 lを生産できるパイロットプラントが完成している。また、ナイシンZ粉末体の供給も可能となった。このようにして調製された粗精製ナイシンZは単体でも効力を発揮したが、抗菌スペクトルが特異的であることから、幅広い菌叢への静菌効果を得るために他の静菌剤との併用が望ましいことがわかり、様々な食品あるいは中間原料など目的に合致した有効な静菌結果が得られた。対象となる食品についても、非加熱食品、十分な殺菌を行われない食品、再加熱されることなく食される食品などに対して広範囲に検討を行っている。

ところで、芽胞菌は芽胞を形成すると一般の殺菌条件で殺菌できず、条件が有利になったとき発芽して増殖を開始する。芽胞菌が増殖すると不快臭を発し、芽胞菌が増殖した食品は風味が低下する。100°C以上での加圧加熱殺菌はいわゆるレトルト臭を発生すると共に、味、食感、色など、本来食品が有する風味を劣化させるため、一般の食品製造工程では採用できない場合が多い。風味の良い上質の食品を製造する上で芽胞菌の問題は生産者を最も苦しめるものである。ナイシンZは芽胞菌の栄養細胞に対して著しい殺菌効果を示すが、芽胞の発芽を抑制するものの芽胞そのものには殺菌効果がなく、非加熱食品中の芽胞数をナイシンで減らすことは困難となっている。

そこで今回、粗精製ナイシンZを芽胞殺菌に利用する手段のひとつとし

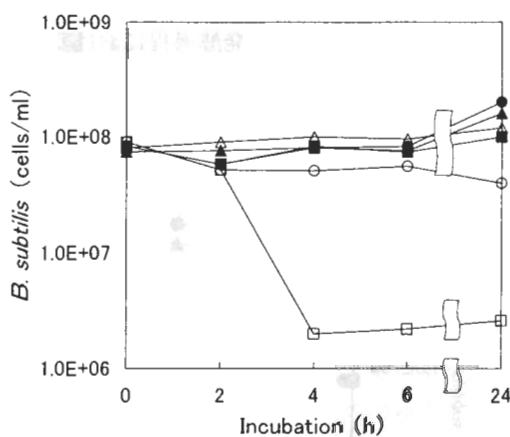


Fig. 2. Synergistic effect of nisin Z and alanine on *Bacillus subtilis* spores. Spore suspension of *B. subtilis* (1×10^8 cells/ml-0.85% NaCl) was incubated at 30°C in the presence of the indicated additives. Symbols: ●, without additives; ○, L-alanine (5 mM) added at 0 h; ▲, nisin Z (100 U/ml) added at 0 h; △, L-alanine (5 mM) and nisin Z (100 U/ml) added at 0 h; ■, nisin Z (100 U/ml) added at 4 h; □, L-alanine (5 mM) added at 0 h and nisin Z (100 U/ml) added at 4 h.

て発芽誘導物質との併用を検討した。すなわち、発芽誘導物質の存在下で芽胞が栄養細胞型になることを利用し、発芽誘導物質添加後にナイシンZを作用させることで非加熱的に芽胞数を減らす方法を試みた。

試験方法は芽胞懸濁液に発芽誘導物質としてL-アラニンを添加したもの、ナイシンZを添加したもの、両方を同時に添加したもの、及びアラニンを添加した30分から4時間後にナイシンZを添加したものを用意し、30℃に保温し経時的に芽胞菌数（生存芽胞と発芽した栄養細胞との合計数）の計測を行った。その結果、L-アラニン添加区にはいずれも発芽誘導が認められ、芽胞の99%が栄養細胞型に変換した。さらにアラニンを添加して4時間後に粗精製ナイシンZを添加した実験区は、その99%の栄養細胞型芽胞菌が殺菌され最終的に芽胞数を99%除去することができた（Fig. 2）。一方、アラニンとナイシンZを同時に添加した場合は芽胞数が減らなかった。原因としては、発芽誘導物質であるアラニンと発芽抑制効果をもつナイシンZが拮抗的に働くことが考えられた。

米、麦、とうもろこしなどの穀類や大豆などの豆類を原料とする麹は発酵食品の中間原料であり、麹の品質がそのまま最終製品の品質を左右する。麹の製造工程において穏和な条件下で雑菌、特に芽胞菌の発育を極力抑制して細菌叢を正常に保ち、雑菌に汚染されない良質の麹を得る技術が求められている。そこで、上記の方法を麹の製造工程に用いた場合についても検討を行った。吸水・蒸煮した大豆に麹菌を接種したのと同時にナイシンZを添加したものと、接種と同時にアラニンを添加した4時間後にナイシンZを添加したものを用意し、開放系での発酵過程における麹菌数と芽胞菌数を測定した。その結果、ナイシンZ単体を添加した場合、添加直後は栄養細胞の殺菌により芽胞菌数が低下するが、3日目以降は無添加区とほぼ変わらない数値となった。一方、アラニンとナイシンZを時間

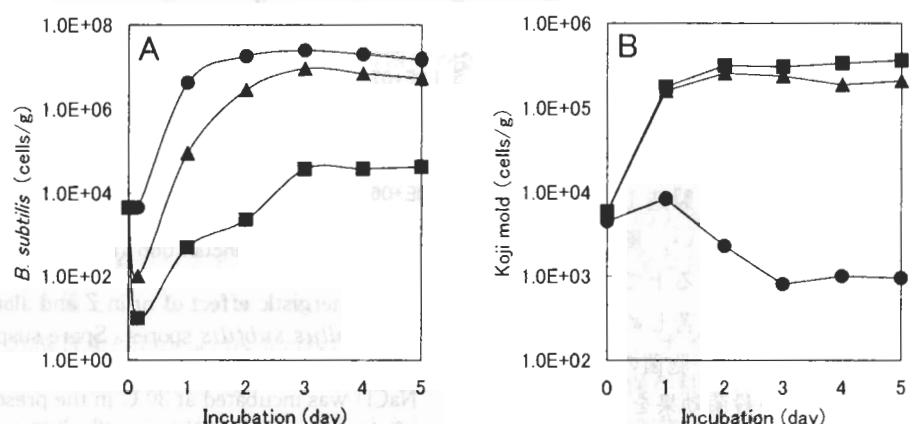


Fig. 3. Synergistic effect of nisin Z and alanine on microbial changes of (A) *Bacillus subtilis* and (B) koji mold during koji fermentation. Soybeans cooked and crushed were inoculated with koji mold and incubated for 2 days at 30°C in the presence of the indicated additives. Koji thus obtained was then stored at 5°C. Symbols: ●, without additives; ▲, nisin Z (400 U/g) added at 0 h; ■, L-alanine (5 mg/g) added at 0 h and nisin Z (400 U/g) added at 4 h.

差で添加した場合は5日目になっても無添加区より2オーダー以上芽胞菌数が低かった (Fig. 3A). なお、大豆の吸水工程や蒸煮工程でのナイシンの添加は効果が認められなかった。麹菌は無添加区では雑菌汚染により生育は見られなかつたが、ナイシンZ単体及びアラニン・ナイシンZ併用区ではいずれも良好な生育を示した (Fig. 3B). アラニン・ナイシンZ併用区では芽胞数が低いことから、発酵物の風味・色調も良かった。

ナイシンはカルシウムイオンやマグネシウムイオンなどの2価カチオンの存在下でリステリア菌に対する抗菌力を失うことが報告されていたが、⁶⁾他の菌に対する知見がないことから、芽胞菌に対する粗精製ナイシンZとカルシウムイオンの併用効果について検討を行つた。試験方法は、芽胞菌液にナイシンZを添加したもの、塩化カルシウムを添加したもの、塩化カルシウムの添加1時間後にナイシンZを添加したもの、ナイシンZの添加1時間後に塩化カルシウムを添加したものを用意し、35℃で培養して経時に菌数を測定した。その結果、ナイシンZと塩化カルシウムの併用区はいずれも著しい静菌効果を示した。特にナイシンZを先に添加した場合に高い静菌効果が得られ、24時間後の菌数は無添加区と比較して6~7オーダー減少した (Fig. 4)。また、瞬間殺菌については30分から1時間が最も効果的であった。ナイシンは一般に速効性の殺菌効果を示すが、長時間食品に接触している間にそれ自体の効力が低下しやすく、以後の雑菌の増殖を許す傾向がある。一方、カルシウムイオンには速効性はないが効力を維持する傾向にあり、この両者を併用することで食品を長期保存することができる。併用効果については、対象となる菌の種類やその機構など、今後詳細に検討する必要がある。

さらに本方法を麹の製造工程に用いた場合についても検討を行つた。吸水・蒸煮した大豆に麹菌を接種し、静菌剤を添加後、開放系で培養期間中の麹菌数と芽胞菌数を測定した。その結果、ナイシンZを添加して1時間後に塩化カルシウムを添加した試験区において6日目でも無添加区より2オーダーほど芽胞菌数が低下した (Fig. 5A)。一方、麹菌はいずれの静菌剤添加区も良好な生育を示した (Fig. 5B)。ナイシンZ+カルシウム添加区は芽胞菌数が低いことから、得られた麹は甘い芳香を有し、白色ないし黄土色であった。これらの結果から、今後併用により粗精製ナイシンZの汎用性が広がることが予想される。

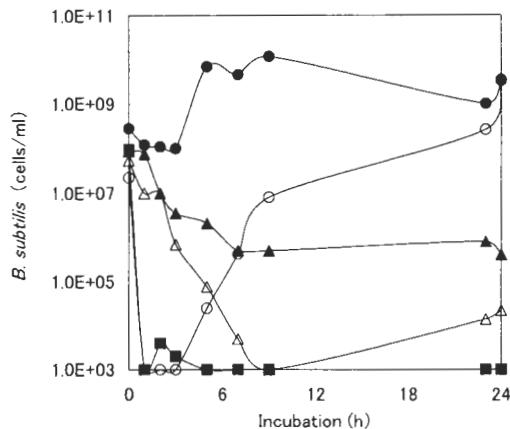


Fig. 4. Synergistic effect of nisin Z and CaCl_2 on *Bacillus subtilis*. *B. subtilis* was inoculated into soybean milk at a level of ca. 10^8 cells/ml and incubated at 35°C in the presence of the indicated additives. Symbols: ●, without additives; ○, nisin Z (200 U/ml) added at 0 h; ▲, CaCl_2 (5% w/v) added at 0 h; △, CaCl_2 (5% w/v) added at 0 h and nisin Z (200 U/ml) added at 1 h; ■, nisin Z (200 U/ml) added at 0 h and CaCl_2 (5% w/v) added at 1 h.

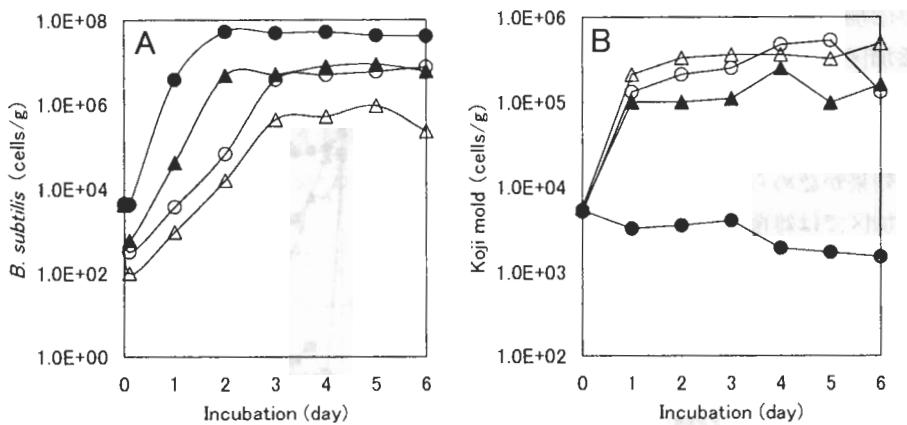


Fig. 5. Synergistic effect of nisin Z and CaCl_2 on microbial changes of (A) *Bacillus subtilis* and (B) koji mold during koji fermentation. Soybeans cooked and crushed were inoculated with koji mold and incubated for 2 days at 30°C in the presence of the indicated additives. Koji thus obtained was then stored at 5°C . Symbols: ●, without additives; ○, nisin Z (200 U/g) added at 0 h; ▲, CaCl_2 (5% w/w) added at 0 h; △, nisin Z (200 U/g) added at 0 h and CaCl_2 (5% w/w) added at 1 h.

以上、芽胞菌の殺菌や増殖抑制に関して新しい方法を紹介してきた。すなわち、ナイシンZと発芽誘導物質やカチオンを併用することで食品中に混入する芽胞菌を著しく減少させることができた。その間、芽胞菌の殺菌・抑制に加熱や加圧などの物理的処理を一切行わないで、食品が元来有する微妙な風味が損なわれない。その結果、食品本来の風味を残したまま芽胞菌数が激減し、その製造過程において芽胞菌が劣勢になり、製品の風味が一段と向上する。本方法は麹の製造工程での雑菌阻止に有効であるばかりでなく、今後、特に非加熱食品中の芽胞を減らす方法として期待される。

4. その他の応用例

乳酸菌バクテリオシンについては単独の効果を検討するだけでなく、前述した我々の研究のように、種々の抗菌物質や殺菌法との併用による相乗作用が広く検討されている。異なる作用機作をもつ抗菌物質や殺菌法の併用は、相加的あるいは相乗的に作用して個々の処理の軽減を可能にする。こうした概念は、Leistnerによってハードルテクノロジーとして提唱されている。⁷⁾つまり、いくつかの保存要因（ハードル）の組み合わせにより、相加的あるいは相乗的な効果（ハードル効果）を生み出そうとするものである。結果として、処理による食品の劣化を最低限にとどめることができるばかりでなく、処理コストの削減や耐性菌の出現を未然に防ぐことも可能となろう。バクテリオシンは、一般にグラム陽性菌にのみにしか抗菌活性を示さないが、相乗作用によってグラム陰性菌やカビ、酵母などの真菌類への効果も期待される。現在までに、ナイシンについては、他の抗菌物質や殺菌法との併用による相乗作用が多数報告されている。^{8,9)}

他の抗菌物質との組み合わせでは、乳酸やプロピオン酸などの有機酸、¹⁰⁾リゾチーム、

¹¹⁾ ラクトバーオキシダーゼ^[2]との併用によって、ナイシンAの効果が相乗的に上昇することが報告されている。また、乳酸菌のバクテリオシンは外膜が存在するグラム陰性菌に対しては抗菌活性を示さないが、EDTAやクエン酸ナトリウムなどのキレート剤との併用により、ナイシンAが大腸菌やサルモネラ菌などのグラム陰性菌の生育も阻害することが明らかとなっている。^[3]

複数の乳酸菌バクテリオシンの併用によっても相乗作用が認められている。ナイシンAとペディオシンPA-1の組み合わせは、リステリア菌やボツリヌス菌に対して相乗的に作用した。^[4] 両バクテリオシンは作用機作が異なると考えられており、併用によってそれらの使用量を軽減できるばかりでなく、耐性菌の出現頻度が大きく低下することが予想される。

他の殺菌法との組み合わせでは、食品のフレーバーを維持するために過度の加熱を避けるという観点から、特に非加熱殺菌法との併用がさかんに試みられている。高圧処理では、ナイシンAとの併用でグラム陽性菌だけでなく、グラム陰性菌に対しても相乗的な効果が見られた。^[5] また、高電圧パルスとナイシンAの併用によっても相乗的な効果が認められた。^[6] このような物理的な殺菌処理は標的細胞に構造上の損傷を与えるため、同様に標的細胞の膜に作用して孔を開けることで抗菌作用を示すバクテリオシンと相乗作用を生じやすいと考えられる。以上のような方法の他にも、炭酸ガス置換包装によってリステリア菌に対するナイシンAの効果が著しく高められたことが報告されている。^[7]

ナイシンをはじめとするバクテリオシンは、前述のように一般に即効性的殺菌効果を示すが、食品成分との作用によりその効力が低下しやすく、効果が維持されにくい傾向がある。それを改善するために、フィルム材やリポソーム中にバクテリオシンを固定化して用いる方法^[8, 19] や、バクテリオシン産生乳酸菌を食品に添加して食品中でバクテリオシンを生産させる方法などが試みられている。これらの方法では、バクテリオシンを食品中に徐々に供給することができ、その効果を長期間維持することができると考えられる。バクテリオシン産生乳酸菌を添加する方法としては、バクテリオシン産生乳酸菌をスターター・カルチャーとして用い、チーズや味噌などの発酵食品中の汚染菌を制御した例が報告されている。^[20, 21]

5. 今後の課題

バクテリオシンに限らず、抗菌物質の継続的な利用により最も懸念されるのは、耐性菌の出現である。耐性菌の蔓延を阻止するには、未だ詳細が明らかとなっていない耐性機構や作用機作を完全に解明し、それに基づくバクテリオシンの適正な利用法を検討する必要があろう。ここで述べた作用機作の異なる抗菌物質や殺菌法との併用は、耐性菌の出現を未然に防ぐ非常に有効な手段と考えられる。さらに、併用によって、これまでバクテリオシンのみでは困難とされてきた、芽胞菌やグラム陰性菌、真菌の制御の実現も期待される。最近の我々の研究では、これまで主な分離源とされてきた発酵食品に限らず、自然界に広くバクテリオシン産生乳酸菌が存在していることが明らかになってきている(Table 2)。作用機作の異なる新奇バクテリオシンの発見も期待され、それらの併用だけでなく、対象

Table 2. New bacteriocin-producing lactic acid bacteria in our laboratory.

Species	Strain	Source	Bacteriocin
<i>Lactococcus lactis</i>	IO-1	Kitchen sink	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	Chizuka, Yasaka	Fermented rice bran (Nukadoko)	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 1	Seaweed	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 3	Corn	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 8	Carrot	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	WNC 20	Fermented sausage (Nham)	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	12N, 18N	Fermented rice noodle	Nisin Z
<i>Lactococcus lactis</i>	61-14	River water	Nisin Q
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 4	Corn	Lactococcin Q
<i>Enterococcus mundtii</i>	QU 2	Soybean	Mundticin
<i>Enterococcus faecium</i>	WHE81	Soft cheese	Enterocin A, B
<i>Pediococcus pentosaseus</i>	TISTR 536	Fermented sausage (Nham)	Pediocin PA-1
<i>Pediococcus acidilactici</i>	S3	Fermented sausage	Pediocin PA-1

となる食品や制御すべき雑菌にあわせて適切なバクテリオシンを選択することも可能となるであろう。

本稿を作成するに当たり、「九州大学新生理活性ペプチド事業準備室」の関係者にお世話になりました。厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 森地敏樹, 松田敏生編著: バイオプリザベーション—乳酸菌による食品微生物制御—, 幸書房 (1999).
- 2) Klaenhammer, T.R.: *FEMS Microbiol. Rev.*, **12**, 39-86 (1993).
- 3) Nes, I.F. et al.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 113-128 (1996).
- 4) 園元謙二: 生物機能の新展開—人類の生存をかけて—, 日本食品出版, p. 65-74 (2000).
- 5) 園元謙二, 石崎文彬: 生物工学, **79**, 182-185 (2001).
- 6) Abee, T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1962-1968 (1994).
- 7) Leistner, L. and Gorris, L.G.M.: *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 41-46 (1995).
- 8) Delves-Broughton, J. et al.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **69**, 193-202 (1996).
- 9) Cleaveland, J. et al.: *Int. J. Food Microbiol.*, **71**, 1-20 (2001).
- 10) Paster, N. et al.: *J. Food Prot.*, **62**, 1223-1227 (1999).
- 11) Chung, W. and Hancock R.E.W.: *Int. J. Food Microbiol.*, **60**, 25-32 (2000).
- 12) Boussouel, N. et al.: *Int. J. Food Microbiol.*, **60**, 169-175 (2000).
- 13) Stevens, K.A. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3613-3615 (1991).
- 14) Hanlin, M.B. et al.: *J. Food Prot.*, **56**, 252-255 (1993).
- 15) Ter Steeg, P.F. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 4148-4154 (1999).
- 16) Pol, I.E. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 428-430 (2000).
- 17) Nilsson, L. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 769-774 (2000).
- 18) Scannell, A.G.M. et al.: *Int. J. Food Microbiol.*, **60**, 241-249 (2000).

- 19) Benech, R.-O. *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.* , **68**, 3683-3690 (2002).
- 20) Kato, T. *et al.* : *Biosci. Biotech. Biochem.* , **65**, 330-337 (2001).
- 21) Harris, L.J. *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.* , **58**, 1484-1489 (1992).

走査トンネル顕微鏡による表面シリサイド形成初期過程の観察： Si(111)7×7 上のBa吸着による(3×1)構造

九州大学大学院総合理工学研究院, *九州大学大学院総合理工学府

柄原 浩, 岡元 亮*, 水野 清義

Scanning tunneling microscopy observation
of the initial formation process of a surface silicide:
A (3×1) structure formed on Si (111)7×7 by Ba deposition

Hiroshi Tochihara, Ryou Okamoto and Seigi Mizuno

Department of Materials Science, Interdisciplinary graduate school
of Engineering Sciences, Kyushu University

Abstract

Ba atom adsorption and subsequent annealing has been studied on Si(111)7×7 using scanning tunneling microscopy at low coverages 0.02~0.04. By annealing to 210~460°C, randomly distributed Ba atoms on terraces at room temperature reach step-down-edges where the 7×7 reconstruction is not formed. Propeller-shaped clusters are observed there. It is found that the 3×1 structure is formed at the cost of the Si bilayer at the upper edges. With the formation of small 3×1 domains, so-called Si magic clusters appear near the domains, which is explained by difference in Si atom density of the 7×7 and 3×1 structures.

1. はじめに

固体表面に異種原子・分子をつけたときに、単なる吸着が起きる場合と基板原子と吸着原子との間の2次元的化合物を形成する場合がある。後者の2次元的化合物を表面物質と呼ぶ。シリコン表面に金属を吸着させ加熱すると表面シリサイドと呼ばれる表面物質が形成する[1]。本研究では、金属としてアルカリ土類金属であるBaを選び、7×7という長周期の再構成表面構造[2]を持つSi(111)表面につけ、表面バリウムシリサイドの形成の初期過程を走査トンネル顕微鏡(Scanning Tunneling Microscopy: STM)を用いて原子レベルで観察した結果を示す。表面バリウムシリサイドの形成は、Si(111)7×7表面とBa原子との間の化学反応の一種と見なすことができる。表面バリウムシリサイドの周期構造は(3×1)であり[3]、(3×1)構造の形成メカニズムを原子レベルで解明することを目的としている。(3×1)構造としては、図1のHCCモデル[4]が有力である。

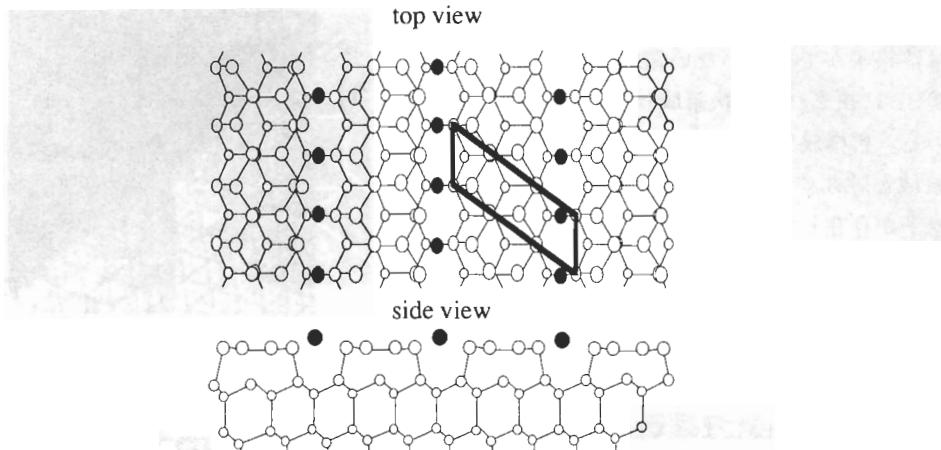


Fig. 1. Honeycomb chain-channel (HCC) model for the (3×1) surface structure formed on Si(111)- 7×7 by Ba atom deposition. The (3×1) unit cell is outlined. Closed and open circles are Ba and Si atoms, respectively.

2. 走査トンネル顕微鏡観察

本実験においてはユニソク製超高真空STM装置(USM-901)を使用した。Ba原子は、市販のBa蒸着源(SAES Getters Inc.)を加熱してSi(111)- 7×7 表面に室温で蒸着した後、所定の温度まで加熱して (3×1) 構造を作製した。今回のBa蒸着量は被覆率にして0.02~0.04である。蒸着時の真空中度は 1.0×10^{-10} Torr以下に保ち、測定時は 5.0×10^{-11} Torrであった。探針はタンゲステンで、電解切断により作製した。探針バイアス電圧は、1~2 Vを使用した。測定はすべて室温でおこなった。

Si(111)- 7×7 表面にBa原子をつけて加熱した表面のSTM像を図2に示す。Ba原子をついたことによって出現した新たなストライプ状構造が、Si(111)- 7×7 表面と共存しているのが観察できる。 7×7 の単位格子と比較することにより、ストライプ状構造の単位格子の大きさが (3×1) と確認できた。

3. Si(111)-(3×1)-Baシリサイドの形成

バリウム原子をつける前のSi(111)- 7×7 表面のSTM像をその概略図とともに図3に示

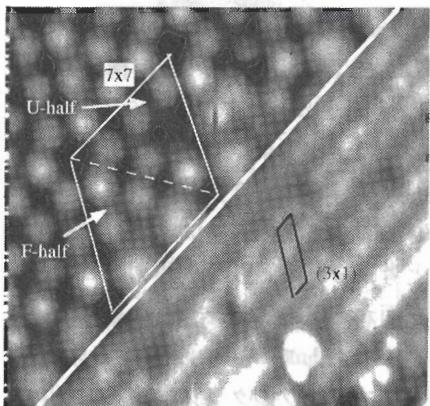


Fig. 2. A filled-state STM image of an annealed surface after Ba deposition. Unit cells of 7×7 and 3×1 are outlined. A border between the clean Si(111)- 7×7 and 3×1 structure is shown by a white line.

す。ステップの下の端には、(7×7)単位格子ができていない領域(線AA',線BB'に挟まれた帯状領域)が存在している。再構成していないので非再構成領域と呼ぶ。そこには既に少量のBa原子が存在している。おそらく、針に付着していたBa原子が表面に落ちてステップ下端まで到達したのであろう。ステップ上端は、(7×7)単位格子で終端しているのが通常であるが[5]、図3において、Baによって既に壊れている部分が認められる。この事実は、Ba原子はステップ上端のSi原子と選択的に反応を起こすことを示している。テラスにもBa原子が明るい輝点として観察できる。

バリウム原子の被覆率が約0.02の表面を260°Cで1分間加熱して得られたSTM像を図4に示す。非再構成領域の幅は図3に比べて広がっており、(7×7)の1~2単位格子分の帯状領域が非再構成領域に変換している。ステップ上端部がBaにより帯状に崩壊したと考えられる。3枚羽根のプロペラを正面から見たような形状の輝点がたくさん存在しているのが観察できる。これをプロペラ型クラスターと名付けた。SiとBa原子から構成される未知の化合物だと考えられるので、化学組成は Si_xBa_y (x,y は整数)で表わされる。この原子配列構造は不明である。

410°Cでサンプルを1分間加熱したとのSTM像を図5に示す。ステップの近傍に3種類の構造体が観察できる。プロペラ型クラスター、(3×1)-Baシリサイド、Siマジッククラスターである。ここで見出されたSiマジッククラスターは、Si(111)清浄表面で報告されているもの[6]と類似のSTM像を示しており、同様なSiマジッククラスターと考えられる。 Si_z (z は整数)と表記する。 z は不明である。(3×1)構造の形成とともに、Siマジッククラスターが出現することは、(3×1)構造と(7×7)構造におけるSi原子密度の違いで説明できる。すなわち、Si(111)表面の(1×1)単位格子あたりの密度は、(3×1)構造と(7×7)

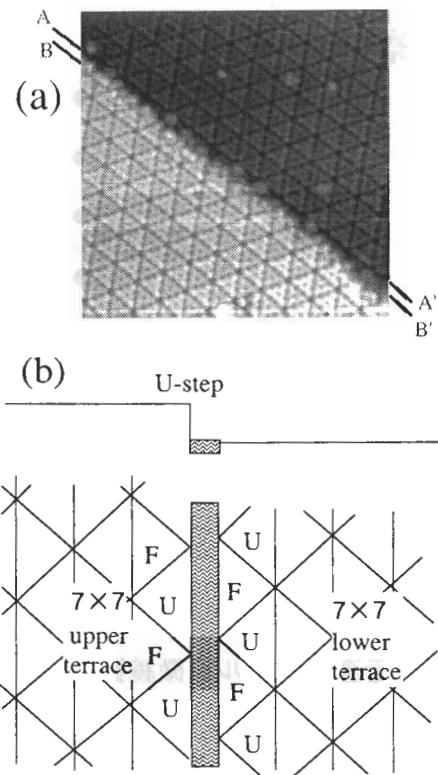


Fig. 3. (a) A filled-state STM image of the clean Si(111) 7×7 surface. Note that some Ba atoms exist along a step edge as well as on terraces, as indicated by brighter protrusions. See text in detail. (b) Schematic drawings of (a) side view (top) and top view (bottom). F and U represent faulted and unfaulted halves of the 7×7 unit cell, respectively. Hatched region shows the unreconstructed surface shown in (a) with lines AA' and BB'.

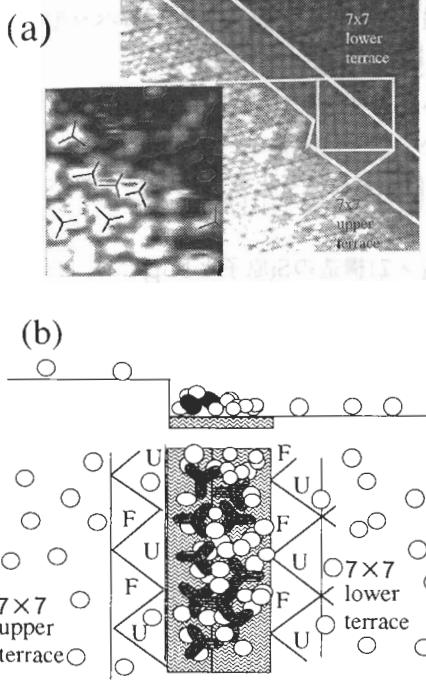


Fig. 4. (a) A filled-state STM image of an annealed surface after Ba deposition. Inset shows propeller-like clusters (Y-shaped) formed on the unreconstructed region (indicated by two lines) in enlarged scale. (b) Schematic drawings of (a) side view (top) and top view (bottom). Ba atoms and propeller-like clusters are shown by open circles and dotted propellers (Y-shaped), respectively.

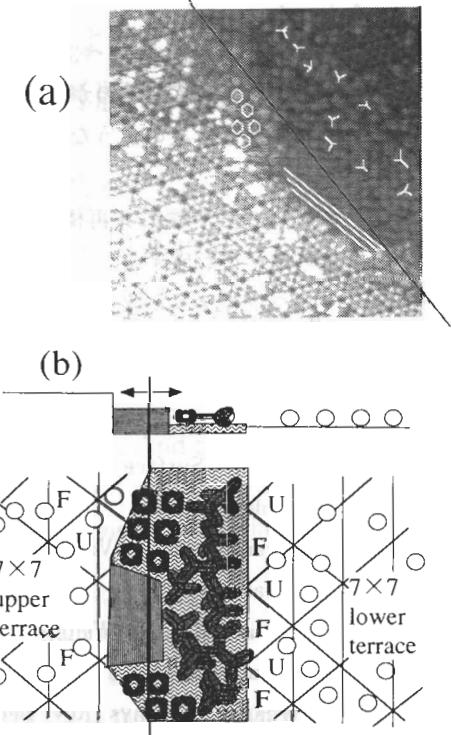


Fig. 5. (a) A filled-state STM image of an annealed surface after Ba deposition. White hexagons and lines show Si magic clusters and the (3×1)-Ba structure, respectively. (b) Schematic drawings of (a) side view (top) and top view (bottom). Notations are same as in Fig. 4. 3×1 structures and Si magic clusters are shown by hatched area and rings, respectively.

構造では、それぞれ1.33および2.08である。したがって、Si(111)-7×7が壊れて、(3×1)-Ba構造ができるときに、(1×1)単位格子あたり0.75個のSi原子が余り、それらがSiマジッククラスターを作ると考えられる。

4.まとめと結論

Si(111)7×7表面にバリウム原子をつけ加熱した。室温に冷却後、STM像を観察し、以下の結果を得た。

- (1) ストライプ状に配列した輝点は、(3×1)の周期性を示し、かつ、提案されているHCCモデルと良い一致を示した。
- (2) (3×1)構造は、ステップの上端を壊して形成する。テラスの(7×7)表面では形成し

なかった。

(3) ステップの近傍では、(3×1)構造の他に、Siマジッククラスター やプロペラ型クラスターが共存しているのが観察された。

以上の結果から、次のような(3×1)表面バリウムシリサイドに関する形成メカニズムを提案する。

- (a) ステップの下端の非再構成領域で、Ba原子は吸着Si原子と反応して、プロペラ型クラスターを形成する。
- (b) プロペラ型クラスターは、ステップ上端の(7×7)構造のSi原子と反応して、(3×1)構造を形成する。そのとき、余ったSi原子は、Siマジッククラスターを形成する。

References

- [1] For example, "Surface Phases on Silicon" by V. G. Lifshits, A. A. Saranin and A. V. Zотов (Wiley, 1994).
- [2] K. Takayanagi et al. J. Vac. Sci. Technol. B4 (1985) 1079.
- [3] G. Lee et al. Phys. Rev. Lett. 87 (2001) 056104.
- [4] S. C. Erwin and H. H. Weitering, Phys. Rev. Lett. 81 (1998) 2296.
- [5] H. Tochihara et al. Phys Rev. B45 (1992) 11332.
- [5] I.-S. Whang et al. Phys. Rev. Lett. 83 (1999) 120.

REFERENCES
ACKNOWLEDGMENTS
REFERENCES

REFERENCES

REFERENCES

REFERENCES

REFERENCES

REFERENCES

REFERENCES

表面ゾル・ゲル法による D-A連結型光電変換多層膜の作製

九州大学大学院工学研究院応用化学部門

秋山 毅, 仁田原 智, 寺崎 正, 山田 淳

Preparation of D-A linked multilayered films for photoelectric conversion using the surface sol-gel method

Tsuyoshi Akiyama, Satoshi Nitahara, Nao Terasaki, And Sunao Yamada

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University

Abstract

Photoresponsive donor-acceptor assemblies via ultrathin titanium oxide layers were constructed on an ITO electrode, by using self-assembling and surface sol-gel methods. The self-assembled monolayer of a thiol derivative of viologen was prepared on the ITO electrode. Then, the ultrathin films of tetracarboxyphenylporphyrin (or a hexacarboxy derivative of a ruthenium(II) complex) and titanium oxide were superimposed on the viologen modified electrode by alternate surface sol-gel processes. Electrochemical and spectral characterizations of the films were carried out.

1. はじめに

近年、火力、水力、原子力等に代表される電気エネルギー源の代替となる新エネルギー源の創出が強く求められている。この新エネルギー源として、事実上無尽蔵に存在する太陽光が有望視されており、すでに実用に供されているシリコン半導体太陽電池や、実用段階寸前にある色素増感半導体太陽電池が活発に研究されている。¹⁾これらに続く全く新規な光電変換系として、金属表面に金属-イオウ結合の形成に伴う自己集合法を用いた電子供与体（D）-電子受容体（A）対からなる単分子膜修飾電極が注目されている（図1）。²⁾こ

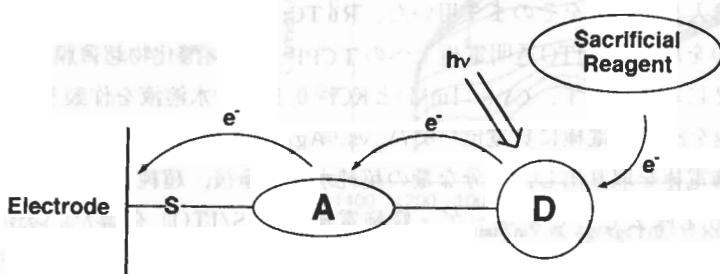


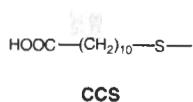
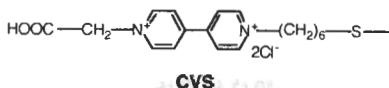
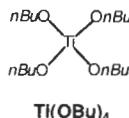
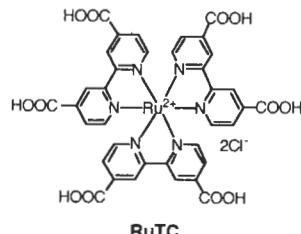
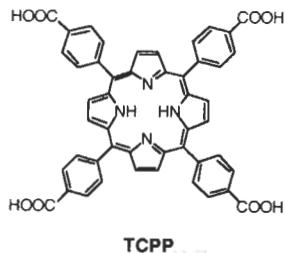
Fig. 1. Scheme of photocurrent generation system using a self-assembled monolayer of D-A pair

の手法は、D-A分子の設計によって、光電変換挙動が制御可能であるという原理的な特色を有しており、極めて興味深い系である。しかしながらD-A連結分子の合成は煩雑で、時間とコストも必要であることが研究の進展や実用への展開を妨げている。そこで、より簡便な手法を用いてD-A対の構成、スクリーニング、最適化が可能になれば、より低コストでしかも容易に多種の光電変換機能を持つ材料を作製する事が可能となり、発電用途のみならず、新規な光分子素子としての機能開拓にもつながることが考えられる。

一方、構造の明確な分子集合体を簡便に形成する手法として、金属酸化物の加水分解反応を応用した表面ゾル・ゲル法があげられる。³⁾この手法は、基板を溶液に浸すだけという簡便な操作で有機-無機ハイブリッド超薄膜の形成が可能であり、一連の薄膜形成操作を繰り返すことでの多層化も容易に行える。さらに光を吸収するD部位の多層化を行うことで、既存のD-A対単分子膜修飾電極では困難であった「単位面積当たりの吸光度の向上」なども容易に実現可能であると期待できる。

我々は、自己集合法と表面ゾル・ゲル法を組み合わせることで光誘起電荷分離系であるD-A対を電極上に形成可能であると考え、光誘起電荷分離系であるポルフィリン(D) - フラーレン(A)対をチタン酸化物超薄膜を介してITO透明電極上に形成することに成功した。⁴⁾そこで本研究では、光電変換の鍵となるD-A対の多様化を目指して、ポルフィリン(D)-ビオローゲン(A)対、ルテニウム(II)錯体(D)-ビオローゲン(A)対を同様の手法で作製することに成功したので、報告する。

2. 修飾電極の作製



TCPPは購入したものをそのまま用いた。RuTC, CVS, CCSについては既報に準じて合成したものを用いた。ITO透明電極上へのTCPP-チタン酸化物超薄膜-CVS集積体の作製方法を図2に示す。まず、CVS(1mM)とKCl(0.1M)の水溶液を作製した。この溶液にITO透明電極を浸し、電極に負電位(-0.7V vs. Ag/AgCl)を印加した状態で3時間放置した。この修飾電極を取り出し、十分な量の超純水で洗浄後、超純水中で1晩放置することで物理吸着分を除去し、ビオローゲン修飾電極(CVS/ITO)を得た。次に、作成したCVS/ITOをTi(OBu)₄(0.1M)のトルエン/エタノール(1:1)溶液に3分間浸し、物理吸着分を洗浄除去をした。引き続いて、水中で加水分解を行い、チタン酸化物超薄膜が

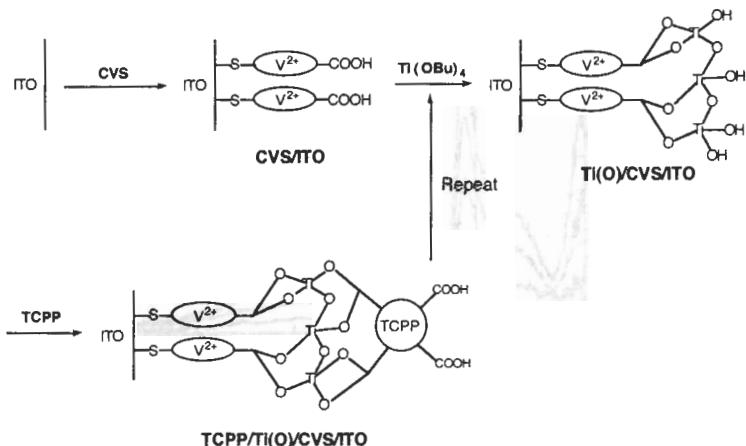


Fig. 2. Formation of $(TCPP/Ti(O))_n/CVS/ITO$

付与された修飾電極 ($Ti(O)/CVS/ITO$)を得た。次に、 $TCPP$ (1mM)のエタノール溶液に $Ti(O)/CVS/ITO$ を浸し、同様に洗浄・乾燥を経て、ポルフィリン単分子層膜をチタン酸化物超薄膜の表層に結合し、D-A修飾電極 ($TCPP/Ti(O)/CVS/ITO$)を得た。この表面ゾル・ゲル法によるチタン酸化物超薄膜とポルフィリン単分子層膜の形成を繰り返すことで、ポルフィリン単分子層膜とチタン酸化物超薄膜が積層化した修飾電極、 $((TCPP/Ti(O))_n/CVS/ITO)$ を得ることができた。なお、対応する参照系として、CVSの代わりにCCSを用いた系や、D部位をRuTCに変更した系についても同様の方法によって修飾電極を得ることができた。

3. 修飾電極の構造確認

作成したCVS/ITOを作用極として三極式電解セルに組み込み、銀塩化銀を参照極、白金線を対極としてKCl水溶液 (0.1M)を電解質に用いてサイクリックボルタントメトリーを行った。その結果、電極上のビオローゲン部位に由来する可逆な還元波を観測することができた(図3)。この還元波の電流値は挿引速度に対して1次に比例しているため、ビオローゲン部位がITO電極上に固定されていることを示す。更に、還元波の解析によりCVSの吸着量は概ね $\sim 6 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ 程度であることがわかった。また($TCPP/Ti(O))_n/CVS/ITO$ ($n=1, 2, 3$)の吸収スペクトル(図4)から、ポルフィリンに特徴的な吸収帯であるSoret帯を明確に

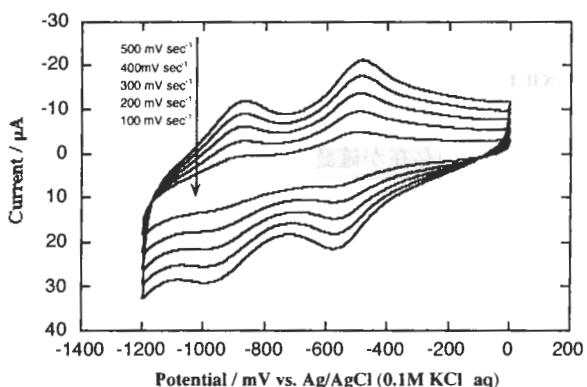


Fig. 3. Cyclic voltammograms of CVS/ITO

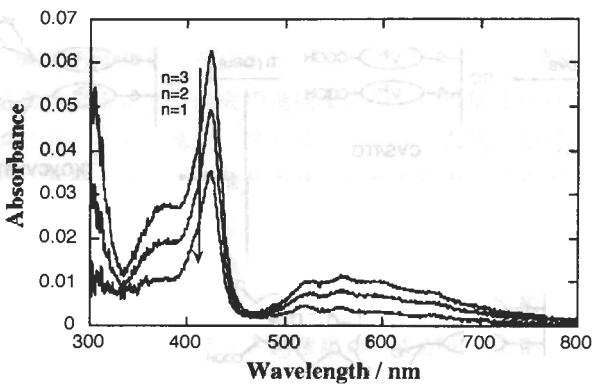


Fig. 4. Absorption spectra of $(\text{TCPP}/\text{Ti}(\text{O}))_n/\text{CVS}/\text{ITO}$ ($n=1, 2, 3$)

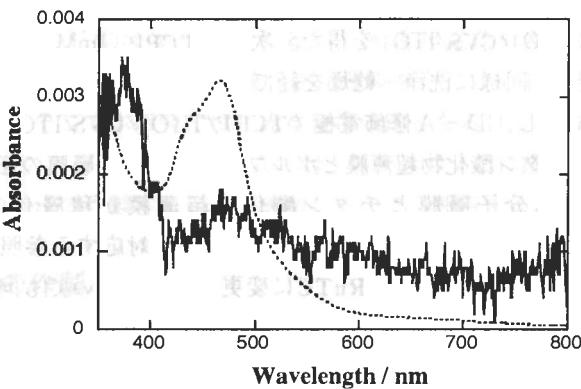


Fig. 5. (solid line) Absorption spectrum of $(\text{TCPP}/\text{Ti}(\text{O}))_n/\text{CVS}/\text{ITO}$,
(dotted line) Absorption spectrum of RuTC in water.

確認することが可能であり、積層回数を増加させるに連れてポルフィリンの吸着量が増えていくことが明らかとなった。

RuTCについても同様の操作で RuTC/Ti(O)/CVS/ITOを作成した。RuTCはモル吸光係数が $10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ と TCPPに比べてかなり小さいにも拘わらず、吸収スペクトル(図5)より RuTCの存在が確認できた。

4. おわりに

以上、表面ゾル・ゲル法を応用した極めて簡便な手法で光励起するD部位とA部位の対を逐次的に電極上に固定することができた。さらに、D部位の多層膜化が可能であることが示されたことから、照射光を無駄なく用いることができるD-A対修飾電極の開発につながる第一歩が実現できることとなる。今後、D部位の積層数や、D部位の構造を変えることにより、高効率光電変換を実現する分子素子を設計したい。

参考文献

- 1) B. O'Regan and M. Gräzel, *Nature* **353**, 737 (1991)
- 2) T. Akiyama and S. Yamada, *Trends in Photochemistry and Photobiology* **8**, 67 (2001)
- 3) I. Ichinose, T. Kawakami and T. Kunitake, *Adv. Mater.* **7**, 535 (1998)
- 4) T. Akiyama, A. Miyazaki, M. Sutoh, I. Ichinose, T. Kunitake and S. Yamada, *Colloid Surf. A* **169**, 137 (2000)

コラーゲンモデルペプチドの3本鎖の融解と 新しい相の出現

九州大学中央分析センター

坂下 寛文, 三浦 好典, 渡辺 美登里

Thermal Melting of Triple Helices and Emergence of
New Phase In Collagen Model Peptide (Pro-Hyp-Gly)₁₀

Hirofumi Sakashita, Yoshinori Miura and Midori Watanabe

The Center for Advanced Instrumental Analysis, Kyushu University

Abstract

Thermal melting of a small rod-like peptide (Pro-Hyp-Gly)₁₀ (abbreviated as (PHG)₁₀) has been investigated in D₂O solution by proton NMR spectroscopy, high sensitive differential scanning calorimetry (DSC) of heat flux type and scanning electron microscopy (SEM). We have found a new (intermediate) phase between the room temperature phase (triple-helix state) and the higher temperature (>100°C) one (single-strand state), this phase has not been observed in a similar peptide (Pro-Pro-Gly)₁₀+D₂O solution. In the intermediate phase melting of both micro-crystals and triple helices proceeds simultaneously, and the solution becomes opaque but not viscous indicating a large fluctuation of density which is probably due to the formation of a new assembly (or clusters) of single strands bound weakly by the hydrogen bond.

1. 緒言

コラーゲンモデルペプタイド(Pro-Pro-Gly)₁₀ (以後, (PPG)₁₀と略記) は水溶液中Tm=60°C付近で3本鎖 \leftrightarrow 1本鎖の融解・形成の可逆変化 (1次相転移) を起こすことが知られている。このペプタイドの2番目のアミノ酸をヒドロキシプロリン(Hyp)に置き換えた(Pro-Hyp-Gly)₁₀ (以後, (PHG)₁₀と略記) も水溶液中で3本鎖 \leftrightarrow 1本鎖の融解・形成の可逆変化を起こす (Tm=40°C付近) ことが知られている。ところが、我々はこの置換により、100°C近傍 (=Tc) に新たな相転移があることを見出した。プロリンとヒドロキシプロリンとの違いは図1に示すように側鎖の一部がCH₂からH-C-OHに替わったにすぎない (図2に3本鎖の側面図と上から見た図を示す)。3本鎖は主鎖間の水素結合によって形成され、側鎖のH-C-OHはこの水素結合には寄与しない。したがって、新たな相転移の出現は側鎖の一部が置き換わったことと、それによる (主鎖間の水素結合以外の) 新たな水素結

合の形成（と共に疎水性相互作用の強さの変化）に起因すると考えられる。さて、ここに上げた2つのモデルペプタイドは水溶液中で結晶化する ((PPG)₁₀についてはすでに知られていたが、(PHG)₁₀については本研究で始めて分かった）。この結晶は3本鎖が集合して形成され、その駆動力は疎水性相互作用が主たる要因であると考えられる。すると、3本鎖の融解・形成と結晶の融解・結晶化が同じ温度で起こっているのか、どう協同しているのか・していないのかという問題が出てくる。また、図2に示すようにこのペプタイドは長さ約10nmの棒状の超微粒子である。一方、結晶は一辺が数10μmの立方体で、いわばマクロなサイズである。蜘蛛の糸は世の中で最も強靭な（細い）糸であることは良く知られている。蜘蛛の糸は平行に走る2本鎖で形成されており、βシート構造と呼ばれている（2本鎖間は水素結合で架橋されている）。コラーゲンは3本鎖でヘリックスを形成し、単独では蜘蛛の糸よりも強い纖維である。ミクロな纖維の物性を調べることは、新しい材料の応用研究にも役立つと思われる。我々は(PHG)₁₀の一連の相転移を超高感度DSC、500MHz プロトンNMR、SEMなどで調べたので報告する。

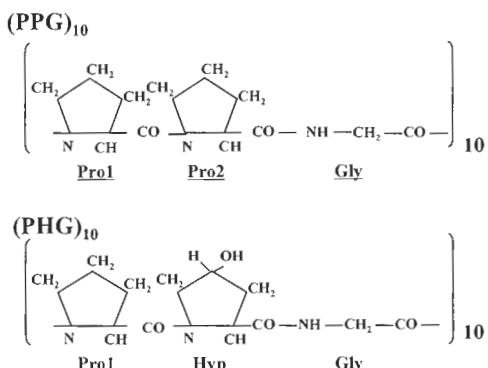


Fig. 1. Chemical formula of collagen like peptides.

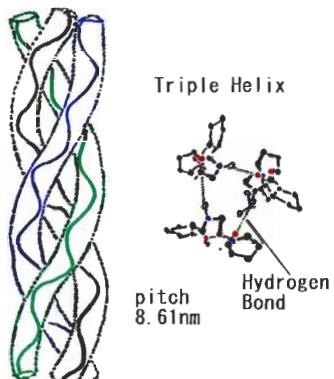


Fig. 2. Triple helices of collagen are shown schematically : side view (left) and top view (right).

2. 実験の概要

(PHG)₁₀ と (PPG)₁₀ の両試料はペプチド研究所〈株〉で合成されたものを用いた。両物質ともコラーゲンとよく似ていて水には溶けにくい。

- (1) NMR測定-----プロトン500MHz NMR（日本電子〈株〉製JMX500）
試料 (PHG)₁₀ 1wt.%重水溶液、ケミカルシフト基準物質トリメチルシリルプロピオン酸ナトリウム(TSP)、測定温度範囲(室温~100°C, 5°Cおき)、各温度では20分間温度を保持した後に積算(100回)を行った。
- (2) DSC測定-----超高感度示差走査熱量計（セイコー電子〈株〉製DSC6100）
NMR試料管から希薄(無色透明)部分と濃厚(乳白色)部分とを採取して試料とした。(PHG)₁₀希薄(重水)溶液試料及び濃厚(重水)溶液試料(70μl Agセル)。

レファレンス試料（重水、 $70\mu\text{l}$ ）。昇温降温のスピードは共に $0.8\text{K}/\text{min}.$ 。温度クエンチは 100°C から 0°C に急冷すること（ピンセットでつまみ、試料容器を氷水に落とし、氷水を攪拌する）によって行った。その後、容器に霜や露がつかなくなるまで数10分間待ってから、DSC装置にセットし測定を開始した。

- (3) SEM-----①走査型電子顕微鏡（島津製作所〈株〉製SS-550）(PHG)₁₀希薄溶液を試料台の上で乾燥したもの。②走査電子顕微鏡（トプコン〈株〉製 ABT-32）(PPG)₁₀ 希薄溶液を試料台の上で乾燥したもの。

3. 相転移の概略

図3に(PPG)₁₀と(PHG)₁₀の示差熱曲線を示す。ピークは潜熱（昇温過程では吸熱）である。(PPG)₁₀の場合、転移は一箇所であるが、(PHG)₁₀では2箇所存在する。図ではそれぞれの相をI, II, III相とした。両物質とも相I \leftrightarrow II間の相転移が3本鎖の融解・形成に対応するが、転移温度は(PHG)₁₀の方が約 20°C も低下している。(PPG)₁₀の 60°C の転移は分子の有限サイズの影響でその温度幅が大きい。また、 35°C を中心にブロードな小さいピークが見られる。一方、(PHG)₁₀では 40°C の転移は比較的シャープに見え、 100°C の転移はブロードに見えるが、 60°C を中心にきわめてブロードなピークも観測される。つまり、側鎖のCH₂がH-C-OHに置換しただけで転移温度が約 20°C も下がったことになり、さらには 100°C あたりに新たな相転移が出現したことになる。

図4に各温度での試料状態の写真を示す。試料溶液を 100°C まで加熱し、完全に溶かしてから室温まで徐冷したものがI相の写真である。試料を再加熱して撮ったものがII, III相の写真である。室温では試料管中の溶液は、上方の無色透明部分と下方の乳白色部分に分離する（この状態で試料管をシャッフルしてしばらく放置すると、一日程度でこの写真のようになる）。室温から温度を上げると 50°C あたりから溶液全体が白濁し、透明部分と乳白色部分の境界は判別不能となる。さらに温度を上げ 80°C を超えると、白濁の程度は弱まり（少しずつ透明になり）、境界が見えてくる。さらなる温

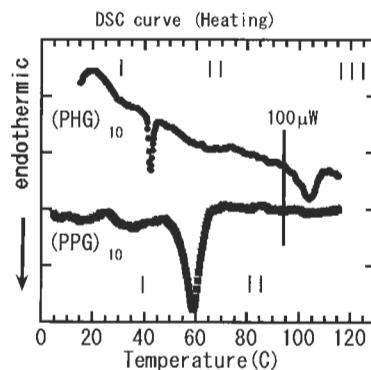


Fig. 3. Typical DSC curves observed in (PHG)₁₀+D₂O and (PPG)₁₀+D₂O solution, both concentration about 1wt.%.

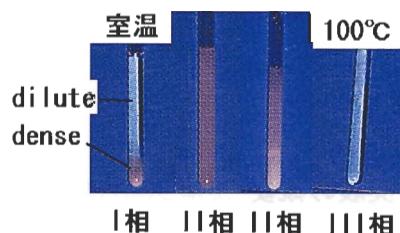


Fig. 4. Photograph, taken at three phases, of (PHG)₁₀+D₂O solution in NMR sample tube.

度上昇とともに、もともと透明であった部分が先に透明になり、乳白色であった部分はおくれて透明になる。100°Cでは溶液全体は完全に無色透明になる。II相での白濁（特に無色透明部分）は、可視光波長程度の長さに渡り、溶液密度がゆらいでいることを示唆している（しかも、その温度範囲は広く約50°Cにも及んでいる）。この白濁状態では溶液はさらさらしていて、蛋白質の変性時に良く見られるゲル状あるいはのり状の少し固化した状態とは異なる。一方、(PPG)₁₀では、I相（室温）の溶液は上方が無色透明で、下方にはきらきらした微結晶が沈殿して見える。温度を上げて、II相に入ると溶液全体が無色透明になる ((PHG)₁₀で見られた白濁はない)。つまり、3本鎖が融けて1本鎖になる。この点では、(PPG)₁₀のII相は(PHG)₁₀のIII相に相当すると考えられる。

図5に(PPG)₁₀微結晶と(PHG)₁₀乳白色部分のSEM像を示す。この乳白色部分はほとんどがサイズ10μm以下の微結晶であるが、無色透明に見えた部分にもμmオーダーの微結晶が多数観察された。一方、(PPG)₁₀ではサイズは数100μmであった。結晶のサイズが前者で1桁も違うことから、側鎖がCH₂からH-C-OHに置換しただけで、結晶成長を大きく阻害しているのは明らかである。結晶化・その成長の主たる駆動力はファンデルワールス力や疎水性相互作用であると考えられるが、側鎖OHによる水素結合導入により、前者2種の力が弱められた可能性が高い。

4. 相転移の試料濃度依存性

図6に無色透明部分のDSC曲線を示す。実験は1回目昇温測定 (0.8K/min.) ⇒ 降温測定 (0.8K/min.) ⇒ 200分間室温保持 ⇒ 2回目昇温測定の順で行った。試料溶液の正確な濃度は分からない（仕込み濃度は1wt.%）が、温度履歴を伴った（熱力学的に）可逆な相転移が観測された。この曲線には以下のような特徴がある。

- (1) 低温側 (T_m) 相転移は1回目と2回目昇温測定で、ピーク位置がずれている。
- (2) 1回目、2回目昇温とともに、25–80°C間で非常にプロードなピーク（即ち、微小な吸熱）が見られる。
- (3) 高温側 (T_c) のピークは1回目昇温では2山の様に見えるが、2回目昇温では完全に2山になっている。
- (4) 降温測定の時、高温側の2山だったものはほぼ1山に見える。低温側の発熱ピーク

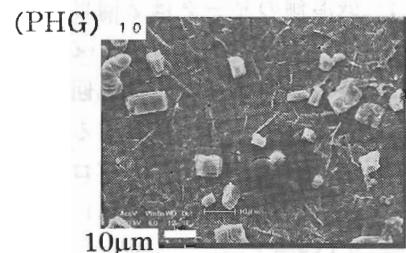
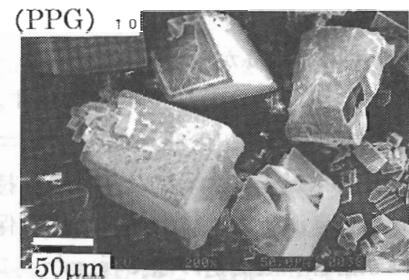


Fig. 5. SEM image of (PPG)₁₀ and (PHG)₁₀ crystals.

は非対称でプロードであり、
45°Cあたりから始まっている。

図7に濃厚部分のDSC曲線を示す。
実験は1回目昇温(0.8K/min.)測定⇒
降温(0.8K/min.)⇒180分間室温保持
⇒2回目昇温測定⇒降温⇒1日室温保持
⇒3回目昇温測定の順で行った。この
曲線の特徴は次のようになる。

- (1) 低温側のピークは2回目昇温で
は完全に2本に割れている。
- (2) 低温側のピークが、3回目の昇
温で大きくかつ鋭くなるとともに、
25–70°C間で、プロードな
すそ野(わずかな吸熱)を引いて
いる。
- (3) 高温側のピークはほぼ割れてい
る。

普通の相転移では、同じ試料で測定
のたびに、振る舞いがこれほど異なる
ことはない。装置の異常か、試料の異
常かと考えられるが、実験を繰り返す
ことにより、どちらでもないことがし
だいに分かってきた。まず第一に、高
温側の2山は、昇温過程で出る最初の
ピークが低濃度部分の転移に対応し、
次のピークが高濃度部分のそれに対応

することが判明した。これは、図4に示したように、昇温過程を目視で観察することで見
出した。次に低温側の転移についてであるが、室温での待ち時間が短いと2山になり、長
時間待つと鋭いピークになることは、結晶化の速度と結晶成長の速度、従って出来た結晶
のサイズ分布が原因であると考えられる。また、非常にプロードなすそ野は、より小さな
微結晶の融解や3本鎖そのものの融解によることを示唆している(しかも、結晶サイズが
小さい程、転移温度が高温側にシフトしているように見える)。

この時点で、いくつかの疑問が発生する。

- (1) 結晶の融解温度と3本鎖の融解温度は一致するのか、異なるのか。
- (2) DSCで観測される潜熱は何に由来するのか。結晶の融解(ファンデルワールス力の
切断)なのか、3本鎖の融解(水素結合の切断)なのか。
- (3) 中間II相の構造・形態はどうなっているのか。(PPG)₁₀の様に3本鎖が融けて、す
べて完全に1本鎖になっておれば、高温側での相転移はない。高温側の転移の存在

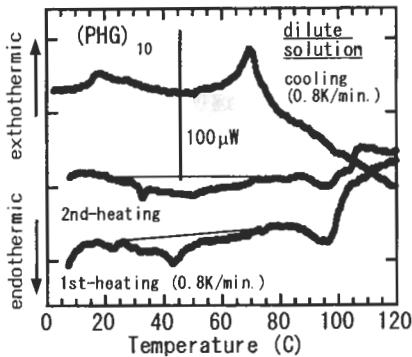


Fig. 6. DSC curves of $(\text{PHG})_{10} + \text{D}_2\text{O}$ dilute solution (<0.5wt.%).

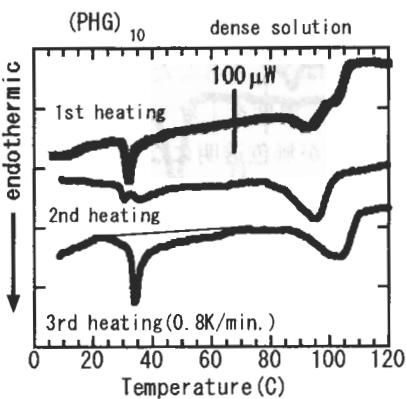


Fig. 7. DSC curves of $(\text{PHG})_{10} + \text{D}_2\text{O}$ dense solution (>1.5wt.%).

は中間Ⅱ相が何らかかの秩序相になっていることを意味している。

以上の点を明らかにするために、NMR測定と急冷実験（DSC測定）を行った。

5. NMRと温度急冷却（DSC）実験

図8に $(\text{PPG})_{10}$ （濃厚1wt.%）非易動性プロトンNMRスペクトルの温度依存性（昇温過程）を示す。水素結合に関する易動性プロトンシグナルは6-9 ppmのケミカルシフト位置に現われるが、本実験では重水溶液のため $\text{H} \leftrightarrow \text{D}$ 置換が起こり観測されない。（すべてのシグナルは同定されているが、ここでは簡単のため一部のみ示した。¹¹ここで、S, Tはそれぞれ1本鎖、3本鎖の状態を、cis, transは1本鎖状態でのコンフォメーションの違いを表す。）室温では、結晶状態あるいは3本鎖状態を反映してシグナルはブロードであるが、高温では融解後の1本鎖状態あるいは熱振動の激しさを反映してシグナルはシャープになる。各シグナルは次の3タイプに分類される。

- (1) 室温から70-75°Cに向かって、強度が減少し、ついには消滅するシグナル（図中○印。3本鎖を反映）。
- (2) 温度上昇とともに70-75°Cあたりから、現われるシグナル（図中□印。1本鎖を反映）。

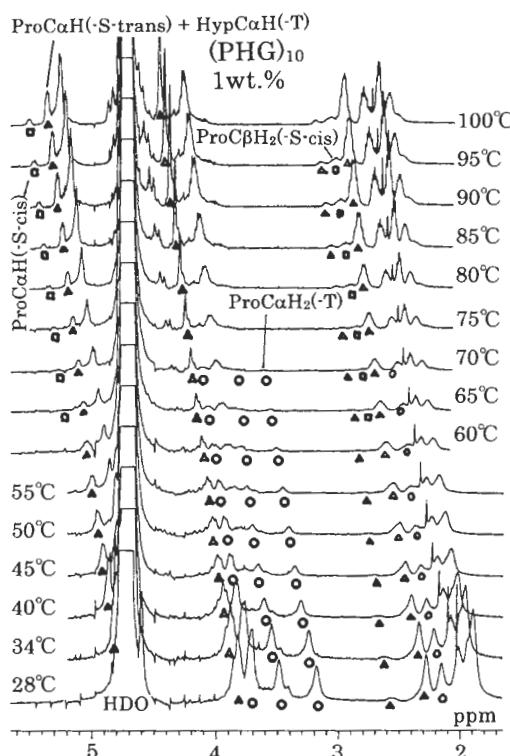


Fig. 8. 500MHz proton NMR spectra of $(\text{PHG})_{10}$ + D_2O solution (1wt.%) as a function of temperature (heating run).

(3) 溫度上昇とともに強度が徐々に減少するが、70-75°Cあたりから増加に転じるシグナル（図中△印。3本鎖と1本鎖とでケミカルシフトの位置がたいして変わらないために、70°C以下では3本鎖を、それ以上では1本鎖を反映している）。

図から明らかな様に3本鎖を反映したシグナルは70-75°Cで消滅し、それに呼応して1本鎖を反映したシグナルが強度を増してくる。この温度はDSCのプロードなすそ野の（高温側の）端の温度とぴったり一致する（希薄、濃厚とも同じ結果）。また、(1) 70-75°Cまでに3本鎖は融けて、完全に1本鎖になっている、(2) 結晶を構成する3本鎖と単独で存在する3本鎖の区別は（NMRでは）つかない、(3) $\text{II} \leftrightarrow \text{III}$ 相転移で特に顕著な振る舞い（状態変化を示唆する情報）は見られない、ことが分かる。

次に融解の逆過程を調べるために温度クエンチを行った。

図9に濃厚試料について、温度クエンチ後のDSC曲線を示す。実験の順序は100°C → 0°Cへ急冷 → 1回目昇温測定 → 降温 (0.8K/min.) → 120分室温で保持 → 2回目昇温測定である。1回目昇温では T_m は39°C, T_c は92°Cである。 T_m で潜熱が観測されたことは、少なくとも3本鎖の融解が起こったことを意味し、従って、この程度の急冷速度（100°Cの試料をピンセットでつかみ0°Cの氷水に移す）では3本鎖は容易に形成されることになる。2回目の昇温測定では T_m が31°C（低温側）へシフトし、もともとの39°Cにも小さな山が残っている。また、この2つの山に対応して、 T_c のピークも2つに割れる（92°Cと101°C）。

$$31^\circ\text{C} \leftrightarrow 101^\circ\text{C}, \quad 39^\circ\text{C} \leftrightarrow 92^\circ\text{C}$$

これらのことから、急冷直後は（あったとしても）結晶サイズはきわめて小さく、2時間の室温アーナーでより大きなサイズの結晶が出来たと考えられる。しかも、より大きな結晶の方が融解温度 T_m が小さいという、驚くべき結果となっている。このことは、希薄試料（図6）の時、 T_m のピークが2回目昇温で低温側へシフトしたこと、また濃厚試料（図7）の時、2回目昇温で T_m のピークが割れた事実とも一致する。

6.まとめ

以上のことから、一連の相転移を図10の様にまとめた。ここでは、3本鎖の集合体としての結晶の融解（及び融解温度 T_m ）と3本鎖 \leftrightarrow 1本鎖の融解（及び融解温度 T_m ）と

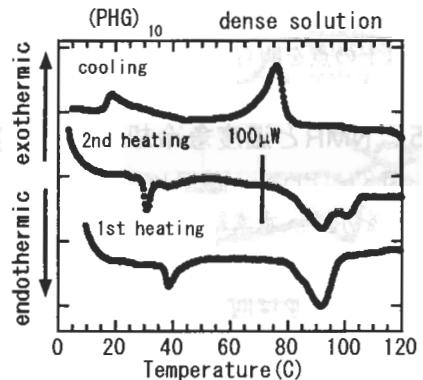


Fig. 9. DSC curves of $(\text{PHG})_{10} + \text{D}_2\text{O}$ dense solution (>1.5wt.%) : sequence of running process ; quench the sample solution from 100 to 0°C → 1st heating run (0.8K/min.) → cooling run (0.8 K/min.) → waiting at room temperature for 2 hours → 2nd heating run (0.8 K/min.).

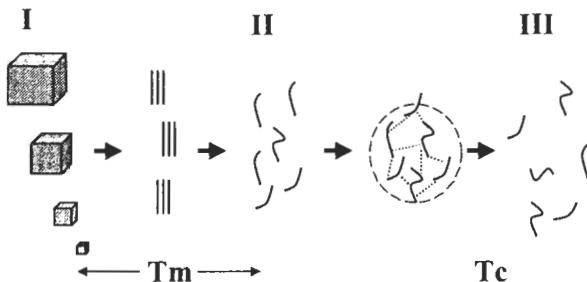


Fig. 10. Schematic summary of our result ; cubes show crystal, three rods and curved rod indicate triple helices and single strand respectively, hydrogen bonding is designated by dotted line.

を区別して考える。

- (1) 結晶のTmはサイズに依存し（分布がある），サイズが大きい方がTmが小さい。
- (2) 3本鎖の融解のTmは結晶のそれよりも大きい。
- (3) 従って，どのサイズの結晶が何個存在するかによって，見かけ上，潜熱ピークはいろいろ変わりうる（低温や高温にシフトして見える）。
- (4) 結晶の融解はファンデルワールス（や疎水性相互作用）の切断であり，3本鎖の融解は主鎖間の水素結合（や疎水性相互作用）の切断である。
- (5) 升温過程において，II相では結晶の融解と3本鎖の融解とが平行して起こる。しかしながら，（この温度範囲内で）より低温側は主に結晶の融解が進行し，より高温側では主に3本鎖の融解（DSCで観測されたプロードなす野領域にあたる）が進行する。
- (6) 3本鎖の融解後，1本鎖同士は完全にはばらばらにならず，おそらく（主鎖だけでなく側鎖OHをも含めた）新たな水素結合がかかり，（液晶に似た）ゆるやかな会合体（集合体）を形成していると考えられる。II相での溶液全体にわたる白濁はこの事実を示唆している。
- (7) その会合体の秩序が完全に壊れる（この時，潜熱が観測される）のがTcであり，しかも会合体の濃度によりTcに分布が現われる。

文献

- 1) T.Kai, S.Uchiyama, T.Yoshida, Y.Kobayashi, K.Kajiyama and T.Tomiyama : Chem. Phys. Lett. 281(1997)86.